

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marjanca BLAS

**ANALIZA TRANSKRIPTOMA PRODUCIRAJOČIH
IN NEPRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ
OVARIJA KITAJSKEGA HRČKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marjanca BLAS

**ANALIZA TRANSKRIPTOMA PRODUCIRAJOČIH IN
NEPRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ OVARIJA KITAJSKEGA
HRČKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF PRODUCING AND NON-
PRODUCING CHINESE HAMSTER OVARY CELL LINES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 10. 9. 2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Kristina Gruden.

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, smer biotehnologija. Večina dela je bila opravljena v Mengšu, na oddelku za Celično in molekularno biologijo, podjetja Lek, d. d., praktični del hibridizacije na mikromrežah pa je bil izveden v Baslu, na oddelku Integrated Biologics Profiling podjetja Novartis Pharma AG v Švici. Zasnova poskusa in statistične analize so potekale v sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za biologijo v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Miomir Knežević
Educell d.o.o., Ustanova za tkiva in celice

Članica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 19.06.2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Marjanca Blas

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 577.2:615(043.3)=163.6
KG	transkriptom/mikromreže/qPCR/celične linije/ovarij/kitajski hrček/CHO/terapevtiki/biološka zdravila
AV	BLAS, Marjanca, univ. dipl. mikrobiol.
SA	GRUDEN, Kristina (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: biotehnologija
LI	2015
IN	ANALIZA TRANSKRIPTOMA PRODUCIRAJOČIH IN NEPRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ OVARIJA KITAJSKEGA HRČKA
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 147 str., 49 pregl., 40 sl., 6 pril., 161 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Celične linije ovarija kitajskega hrčka (CHO) so najpogosteje uporabljene sesalske celice za proizvodnjo farmacevtskih terapevtikov. Razvoj biološko podobnih zdravil se začne s transfekcijo ekspresijskega vektorja v različne starševske celične linije CHO in prek različnih korakov selekcije vodi do nastanka končne produkcijske celične linije. S proučevanjem transkriptoma s tehnologijo mikromrež in PCR v realnem času (qPCR) ter tudi z analizo kariotipov smo poglobili razumevanje celostnega izražanja genov v starševskih ter različno producirajočih celičnih linijah. Z analizo transkriptoma neproducirajočih starševskih celičnih linij smo ugotovili, da različne celične linije CHO lahko zanesljivo ločujemo glede na njihov ekspresijski profil. Ugotovili smo, da so različni kloni glede na celostno izražanje genov bolj podobni starševskim celičnim linijam, iz katerih izvirajo, kot pa klonom s podobnimi rastnimi ali produkcijskimi sposobnostmi. Dokazali smo, da je podobnost transkripcijskih profilov odvisna od zgodovine nastanka starševskih celičnih linij, vendar neodvisna od manipulacijskih korakov, ki so značilni za razvoj rekombinantnih celičnih linij. Dodatno smo identificirali gene z edinstvenim profilom izražanja, ki omogočajo ločevanje med analiziranimi starševskimi, pa tudi različnimi producirajočimi rekombinantnimi celičnimi linijami, ki izvirajo iz iste starševske celične linije. S tehnologijo mikromrež smo proučevali izražanje genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa, ki pozitivno korelira s produktivnostjo, medtem ko število kopij transgenov ni povezano z visoko produktivnostjo. Identificirali smo tudi večje število označevalnih genov za visoko produktivnost. Ti predstavljajo kandidate za razvoj orodja, temelječega na metodi qPCR, za presejanje večjega števila klonov zgodaj v razvoju rekombinantnih celičnih linij, pa tudi pomembne kandidate za izboljšanje starševskih celičnih linij z metodami celičnega inženiringa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDK 577.2:615(043.3)=163.6
CX transcriptome/microarray/qPCR/chinese hamster/ovary/cell lines/CHO/
therapeutics/biological drugs
AU BLAS, Marjanca
AA GRUDEN Kristina (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological
and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY 2015
TI TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF PRODUCING AND NON-PRODUCING
CHINESE HAMSTER OVARY CELL LINES
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 147 p., 49 tab., 40 fig., 6 app., 161 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Chinese hamster ovary (CHO) cell lines are the most widely used mammalian cell type for
the production of recombinant therapeutic proteins. Cell line development for the
production of biosimilars starts with the transfection of the expression vector into various
CHO parental cell lines followed by different selection steps, which results in the
generation of the final production cell line. With the transcriptome analysis using
microarrays and real-time PCR (qPCR), supported by the karyotype analysis, we
broadened the knowledge of the whole gene expression of parental cell lines and different
producing cell lines. Expression profiles of parental cell lines enable effective
differentiation between them. We demonstrated that similarity of the overall transcriptional
profiles is dependent on cell line history but independent of the manipulation steps
involved in the recombinant cell-line development process. Additionally, we identified
marker genes that are unique to specific parental as well as recombinant producing CHO
cell lines. We showed that expression of the gene for the light- and heavy chain of
monoclonal antibody is positively correlated with productivity while the number of copies
of the transgenes is not associated with high productivity. Moreover, we identified a large
number of marker genes for high productivity using microarray technology. The identified
marker genes associated with productivity represent candidates for the development of a
qPCR method-based tool for the screening of a large number of clones early in the
development of recombinant cell lines. These marker genes also represent potential
candidates for improvement of parental cell lines using cell engineering methods.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
SEZNAM OKRAJŠAV	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN IN CILJI ŠTUDIJE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 CELIČNE LINIJE CHO	2
2.1.1 Zgodovina celičnih linij CHO.....	2
2.1.2 Razvoj rekombinantnih celičnih linij CHO v farmacevtski industriji	3
2.1.3 Seleksijski sistemi	5
2.1.4 Število kopij transgenov, raven izražanja in vpliv na produktivnost.....	6
2.1.5 Kariotip.....	7
2.2 UPORABA TEHNOLOGIJ '-OMIK' PRI KARAKTERIZACIJI CELIC CHO	9
2.2.1 Genom celic CHO	9
2.2.2 Transkriptom celic CHO	10
2.2.2.1 Tehnologije transkripcijskega profiliranja.....	10
2.2.2.1.1 Mikromreže	11
2.2.2.1.2 PCR v realnem času (qPCR)	12
2.2.2.1.3 Sekvenciranje RNA	12
2.2.2.2 Transkriptom celic CHO	13
2.3 CELIČNI INŽENIRING	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 IZBOR CELIČNIH LINIJ	17
3.1.1 Pogoji gojenja.....	17
3.2 KARIOTIPIZACIJA	17
3.2.1 Priprava metafaznih kromosomov.....	17
3.2.2 Barvanje z raztopino Giemse.....	18
3.2.3 Mikroskopiranje in analiza.....	18
3.3 PRIPRAVA PRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ.....	18
3.3.1 Transfekcije in ekspresijski vektor	18
3.3.2 Analiza mešanih populacij celic	19
3.3.3 Kloniranje in analiza klonov	19
3.4 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN.....	20
3.5 OBRATNO PREPISOVANJE	21

3.6	MIKROMREŽE	22
3.6.1	Prepisovanje <i>in vitro</i>	22
3.6.2	Hibridizacija	24
3.6.3	Preverjanje kakovosti podatkov iz mikromrež in normalizacija	25
3.6.4	Statistični modeli	25
3.6.4.1	Analiza transkriptoma starševskih celičnih linij	26
3.6.4.2	Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah	26
3.6.4.3	Analiza transkriptoma producirajočih celičnih linij	27
3.6.5	Obogatitvena analiza na ravni procesov (GSEA)	27
3.7	PCR V REALNEM ČASU (QPCR)	27
3.7.1	Določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa	28
3.7.2	Določevanje prisotnosti določenih genov v genomu	28
3.7.3	Analiza izražanja genov	29
3.7.3.1	Testiranje na prisotnost genomske DNA	29
3.7.3.2	Izvedba reakcije qPCR za analizo izražanja genov	29
3.7.4	Obdelava podatkov	30
4	REZULTATI	32
4.1	IZBOR CELIČNIH LINIJ	32
4.2	KARIOTIP IZBRANIH STARŠEVSKIH CELIČNIH LINIJ	33
4.3	PRIPRAVA PRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ	36
4.3.1	Transfekcije in ekspresijski vektor	36
4.3.2	Analiza mešanih populacij celic	36
4.3.3	Kloniranje in analiza klonov	38
4.4	ANALIZE NA RAVNI DNA	41
4.4.1	Izolacija DNA	41
4.4.2	Določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa	41
4.5	ANALIZE NA RAVNI RNA	44
4.5.1	Mikromreže	44
4.5.1.1	Izolacija celokupne RNA, sinteza cDNA, priprava aRNA	44
4.5.1.2	Hibridizacija	46
4.5.1.3	Preverjanje kakovosti mikromrež	46
4.5.1.4	Obdelava podatkov	48
4.5.1.4.1	Primerjalna analiza transkriptoma različnih starševskih celičnih linij	50
4.5.1.4.2	Analiza izražanja <i>rDHFR</i> in <i>hDHFR</i>	64
4.5.1.4.3	Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah	67
4.5.1.4.4	Analiza vpliva jakosti produkcije na transkriptom celičnih linij	73
4.5.2	Potrjevanje izražanja genov s PCR v realnem času	85
4.5.2.1	Testiranje na prisotnost genomske DNA	85
4.5.2.2	Preverjanje ustreznosti testov TaqMan Gene Expression	85
4.5.2.3	Obdelava podatkov	85

4.5.2.3.1	Analiza transkriptoma starševskih celičnih linij.....	86
4.5.2.3.2	Analiza izražanja <i>rDHFR</i> , <i>hDHFR</i> in <i>Neo</i>	88
4.5.2.3.3	Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah	90
4.5.2.3.4	Analiza vpliva jakosti produkcije na transkriptom celičnih linij.....	92
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	96
5.1	RAZPRAVA.....	96
5.1.1	Izbor celičnih linij.....	96
5.1.2	Ločevanje celičnih linij CHO na podlagi njihovih kariotipov.....	96
5.1.3	Načrt procesa priprave končne produkcijske celične linije.....	97
5.1.4	Število kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa in vpliv na produktivnost	98
5.1.5	Identifikacija označevalnih genov za ločevanje različnih celičnih linij	99
5.1.6	Primerjava izražanja vnesenega <i>rDHFR</i> in endogenega <i>hDHFR</i>	102
5.1.7	Vpliv selekcijskih učinkovin (G418, MTX) na izražanje genov	103
5.1.8	Identifikacija označevalnih genov za visoko produktivnost.....	104
5.2	SKLEPI.....	107
6	POVZETEK (SUMMARY)	109
6.1	POVZETEK.....	109
6.2	SUMMARY.....	111
7	VIRI	113
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled vzorcev po celičnih linijah, uporabljenih v naši študiji.....	17
Preglednica 2: Pregled vseh ustvarjenih mešanih populacij celic v tej študiji	19
Preglednica 3: Sestava reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification	21
Preglednica 4: Temperaturni potek reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification	21
Preglednica 5: Sestava reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov SuperScript VILO cDNA Synthesis	22
Preglednica 6: Temperaturni potek reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov SuperScript VILO cDNA Synthesis	22
Preglednica 7: Sestava reakcije prepisovanja <i>in vitro</i> za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification	23
Preglednica 8: Temperaturni potek reakcije prepisovanja <i>in vitro</i> za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification	23
Preglednica 9: Sestava reakcije fragmentacije aRNA s kompletom MessageAmp Premier RNA Amplification.....	23
Preglednica 10: Sestava hibridizacijske reakcije s kompletom GeneChip Hybridisation, Wash and Stain	24
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa s qPCR	28
Preglednica 12: Pogoji namnoževanja pri qPCR.....	28
Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za določevanje prisotnosti določenih genov v genomu s qPCR	29
Preglednica 14: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za qPCR	29
Preglednica 15: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za analizo izražanja genov s qPCR.....	30
Preglednica 16: Število kromosomov v analiziranih starševskih celičnih linijah CHO.....	33
Preglednica 17: Mešane populacije celic, izbrane za kloniranje	38
Preglednica 18: Pregled števila vseh klonov ter število klonov, izbranih za nadaljnje analize transkriptoma.....	39
Preglednica 19: Oznake izbranih klonov s produktivnostjo iz stresalnih plastenkov	40
Preglednica 20: Število kopij genov za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo, preračunano na haploidni genom	42
Preglednica 21: Število setov sond, značilnih za posamezno celično linijo glede na njihovo izraženost	53
Preglednica 22: Geni, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije	54
Preglednica 23: Opis funkcije genov, izbranih za ločevanje med celičnimi linijami.....	56
Preglednica 24: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der1 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	57
Preglednica 25: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der1 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	58

Preglednica 26: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der2 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	58
Preglednica 27: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der2 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	58
Preglednica 28: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der3 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	59
Preglednica 29: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der4 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	60
Preglednica 30: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der4 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	61
Preglednica 31: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der6 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	63
Preglednica 32: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der6 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO	64
Preglednica 33: Različno izraženi geni pri primerjavi gojenja z G418 (G418 kloni) in kombinacijo G418 in MTX (MTX kloni) za vse celične linije hkrati	67
Preglednica 34: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der1	69
Preglednica 35: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der2	70
Preglednica 36: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der3	71
Preglednica 37: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der4	72
Preglednica 38: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der6	72
Preglednica 39: Različno izraženi geni pri primerjavi visoko producirajočih klonov z nizko producirajočimi kloni za vse celične linije hkrati v analizi z mikromrežami	75
Preglednica 40: Seznam genov z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der1	78
Preglednica 41: Seznam genov z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der1	79
Preglednica 42: Seznam genov z zvišanim in znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der2	80
Preglednica 43: Seznam genov z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der3	81
Preglednica 44: Seznam genov z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der3	82
Preglednica 45: Seznam genov z zvišanim in znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der4	82
Preglednica 46: Povzetek rezultatov qPCR za gene z edinstveno izražanje, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije	88

Preglednica 47: Analiza qPCR, izvedena na vzorcih genomske DNA starševskih celičnih linij	88
Preglednica 48: Povprečne vrednosti izražanja, pridobljene s qPCR, pripadajoči standardni odkloni, razlika v izražanju ter vrednosti p za gen <i>Slc17a6</i> v primerjavi G418 proti MTX klonom.....	91
Preglednica 49: Povprečne vrednosti izražanja, pridobljene s qPCR, pripadajoči standardni odkloni, razlika v izražanju ter vrednosti p za izbrane gene v primerjavi visoko producirajočih (V) proti nizko producirajočim (N) klonom	94

KAZALO SLIK

Slika 1: Pregled procesa razvoja rekombinantnih celičnih linij; (A) transfekcija in selekcija, (B) kloniranje in selekcija klonov (Jostock, 2011).....	4
Slika 2: 22 kromosomov kitajskega hrčka (levo) in 21 kromosomov izvirne celične linije CHO-K1 (desno), pridobljenih z barvanjem po Giemsi (Wurm, 2013).....	8
Slika 3: Shema načrtovanja sond na mikromrežah proizvajalca Affymetrix (Kantardjieff, 2009).....	12
Slika 4: Shema dela	32
Slika 5: Izvor analiziranih starševskih celičnih linij CHO	33
Slika 6: Kariotip celične linije CHO der1	34
Slika 7: Kariotip celične linije CHO der2	34
Slika 8: Kariotip celične linije CHO der3	35
Slika 9: Kariotip celične linije CHO der4	35
Slika 10: Kariotip celične linije CHO der6	36
Slika 11: Produktivnost mešanih populacij celic po selekciji z G418.....	37
Slika 12: Produktivnost mešanih populacij celic po selekciji z G418 in MTX.....	37
Slika 13: Razvrstitev klonov glede na produktivnostno skupino in z upoštevanjem okvarjenosti transgenov	43
Slika 14: Produktivnost in število kopij gena za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo v vseh izbranih klonih	44
Slika 15: Primer elektroferogramov kapilarne elektroforeze (Bioanalyser) totRNA.....	45
Slika 16: Primer uspešne hibridizacije oligonukleotida B2 na robovih in v kotu mikromrež	47
Slika 17: Kontrola hibridizacije.....	48
Slika 18: Analiza glavnih komponent (PCA) vseh vzorcev, ki temelji na podatkih celokupnega transkriptoma	49
Slika 19: Profil izražanja genov pri različnih celičnih linijah	50
Slika 20: Vennovi grafikoni, ki predstavljajo število, značilno različno izraženih setov sond za vse možne pare celičnih linij CHO.....	51
Slika 21: Število različno izraženih setov sond, ki smo jih zaznali z analizo mikromrež pri primerjavi različnih parov starševskih celičnih linij	52
Slika 22: Relativno izražanje genov, izbranih za ločevanje med celičnimi linijami.....	55
Slika 23: Primerjava relativnega izražanja genov <i>rDHFR</i> in <i>hDHFR</i>	65
Slika 24: Relativno izražanje genov za lahko in težko verigo IgG ter <i>rDHFR</i> , pridobljeno z mikromrežami za posamezne celične linije	66
Slika 25: Relativno izražanje izbranih genov iz primerjave vpliva tipa selekcijskega pritiska G418 oziroma MTX za vse celične linije hkrati	68
Slika 26: Primerjava relativnega izražanja gena <i>Slc17a6</i> pri gojenju celic z MTX ali brez njega	73
Slika 27: Izražanje genov za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo IgG ter prikaz produktivnosti za posamezne klone	74

Slika 28: Korelacija med produktivnostjo in izražanjem gena za lahko verigo (A) oz. težko verigo (B) IgG	74
Slika 29: Relativno izražanje 12 genov, identificiranih kot diferencialno izraženih v primerjavi visoko producirajočih klonov z nizko producirajočimi kloni za vse celične linije hkrati	76
Slika 30: Analiza glavnih komponent (PCA) visoko in nizko producirajočih klonov	77
Slika 31: Primerjava relativnega izražanja izbranih genov pri visoko in nizko producirajočih klonih posameznih celičnih linij	84
Slika 32: Vrednosti Cq štirih referenčnih (normalizatorskih) genov in povprečna vrednost Cq pri 103 vzorcih	85
Slika 33: Analiza primernosti referenčnih genov, dobljenih z uporabo statističnih programov (A) geNorm in (B) NormFinder	86
Slika 34: Ozačevalni geni za ločevanje posamezne celične linije CHO	87
Slika 35: Prikaz ujemanja izražanja genov <i>rDHFR</i> in <i>hDHFR</i> , pridobljenih z mikromežami in qPCR	89
Slika 36: Relativno izražanje za <i>rDHFR</i> in <i>Neo</i> , pridobljeno s qPCR za posamezne celične linije	90
Slika 37: Razlika v izražanju izbranih genov pri gojenju z G418 (G418 klonih) ali kombinacijo G418 in MTX (MTX klonih), dobljena z mikromrežami in qPCR	91
Slika 38: Razlika v izražanju izbranih genov pri visoko/nizko producirajočih klonih, dobljena z mikromrežami in qPCR	93
Slika 39: Prikaz izražanja 6 označevalnih genov, značilnih za visoko produktivnost	95
Slika 40: Prikaz genov <i>DHFR</i> in <i>Msh3</i> na mišjem kromosomu 13 (ENSEMBL, 2014) ..	100

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der1 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plasten (SF)
- Priloga B: Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der2 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plasten (SF)
- Priloga C: Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der3 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plasten (SF)
- Priloga D: Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der4 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plasten (SF)
- Priloga E: Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der6 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plasten (SF)
- Priloga F: Primer poročila kontrole kakovosti s programom Expression Console (Affymetrix) za celično linijo CHO der4

SEZNAM OKRAJŠAV

CHO	ovarij kitajskega hrčka (angl. Chinese hamster ovarium)
cDNA	komplementarna DNA
der	derivat
DEPC	dietilpirokarbonat
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DMSO	dimetil sulfoksid
EMS	etil-metan-sulfonat
EST	izražene oznake zaporedij (angl. expressed sequence tags)
FC	razlika v izražanju genov (angl. fold change)
G418	geneticin
G418 mpc/kloni	geneticinske mpc/geneticinski kloni, selekcionirani z G418
gDNA	genomska DNA
hDHFR	hrčkov DHFR
FISH	fluorescentna hibridizacija <i>in situ</i>
IgG	imunoglobulin G
log ₂ FC	logaritmirana razlika v izražanju
Lv	lahka veriga IgG
mAb	monoklonsko protitelo
MCB	osnovna celična banka (ang. master cell bank)
miRNA	mikro RNA
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
MTX	metotreksat
MTX mpc/kloni	metotreksatne mpc/metotreksatni kloni, selekcionirani z G418 in MTX
mpc	mešana populacija celic (angl. pool)
<i>Neo</i>	gen za aminoglikozid fosfotransferazo oz. gen za odpornost proti neomicinu
NGS	sekvenciranja naslednje generacije (angl. next generation sequencing)
PCA	analiza glavnih komponent (angl. principal component analysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
qPCR	PCR v realnem času
rDHFR	rekombinantni DHFR
rpm	obrti na minuto (angl. revolutions per minute)
RT-qPCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNAi	interferenca RNA
SD	standardni odklon
SF	stresalna platenka (angl. shaking flask)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism)
totRNA	celokupna RNA
Tv	težka veriga IgG
ZFN	nukleaze z motivom zinkovih prstov (angl. zinc finger nucleases)
WCB	delovna celična banka (angl. working cell bank)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Namen dela sta bili analiza transkriptoma različnih starševskih neproducirajočih celičnih linij ovarija kitajskega hrčka (CHO) in analiza transkriptoma producirajočih celičnih linij, ki proizvajajo monoklonska protitelesa (mAb). Znotraj analize producirajočih celičnih linij smo primerjali izražanje genov v primeru transfekcije z dvema različnima ekspresijskima vektorjema, opazovali izražanje genov pri dobrih in slabih producentih mAb ter spremljali ekspresijske profile producirajočih celičnih linij na ravni različnih stopenj selekcij (antibiotik, metotreksat). Kot rezultat primerjalnih analiz transkriptoma na različnih stopnjah razvoja celičnih linij je bil namen dela tudi iskanje potencialnih genetskih označevalcev za morebitne genetske modifikacije, ki bi lahko bile zanimive za industrijsko uporabo.

1.2 NAMEN IN CILJI ŠTUDIJE

- Poiskati razlike ali podobnosti transkriptoma med neproducirajočimi in istoizvornimi producirajočimi celičnimi linijami CHO ter morebitno zmanjšanje števila celičnih linij za produkcijo določenih biološko podobnih zdravil oziroma mAb.
- Poiskati razlike ali podobnosti transkriptoma med producirajočimi celičnimi linijami CHO, ki vsebujejo različna ekspresijska vektorja, ter potrditi ali ovreči namen uporabe enega ekspresijskega vektorja, ki bo zagotavljal visoko produktivnost celičnih linij in hkrati ustrezno kakovost biološko podobnega materiala.
- Namen je bil tudi iskanje genetskih označevalcev za namen genetskih modifikacij v pomenu oblikovanja ustrezne celične linije za proizvodnjo monoklonskega protitelesa z zaželenimi lastnostmi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIČNE LINIJE CHO

Za razvoj biofarmaceutskih produktov, kot so monoklonska protitelesa, hormoni, citokini in nekateri krvni produkti (Datta in sod., 2013), se uporabljajo številne sesalske celice: mišje mielomske celice (celice NS/0, SP2/0), mišje fibroblastne celice, človeške embrionalne ledvične celice (celice HEK 293), ledvične celice mladičev hrčkov (celice BHK), človeške celice mrežnice (celice PerC6) ter ovarijske celice kitajskega hrčka (celice oz. celične linije CHO) (Baldi in sod., 2005; Barnes in sod., 2001; Bebbington in sod., 1992; Griffin in sod., 2007; Jones in sod., 2003). Izmed naštetih so celice CHO najpogostejše uporabljene sesalske celične linije (Birch in Racher, 2006; Jayapal in sod., 2007; Omasa in sod., 2010; Walsh, 2010; Zhu, 2012).

Prvo klinično odobreno biološko zdravilo, proizvedeno v celicah CHO, je bil tkivni aktivator plazminogena (t-PA) (Kaufman in sod., 1985). Od takrat je v celicah CHO proizvedeno več kot 70 % vseh terapevtskih proteinov (Jayapal in sod., 2007; Walsh, 2010).

Razlogi, da so celice CHO prevladujoči ekspresijski sistem za proizvodnjo biofarmaceutskih produktov, ki so večinoma glikoproteini, so v njihovi sposobnosti rasti do visokih gostot v bioreaktorjih (Wurm, 2004), dovzetnosti za genetske manipulacije (Cacciatore in sod., 2010), podobnosti sestave N-glikanov s človeškimi proteini in posledično neimunogenosti za človeka (Jayapal in sod., 2007) ter nenazadnje tudi zaradi nizkega tveganja za okužbo in prenos človeških virusov (Cacciatore in sod., 2010).

2.1.1 Zgodovina celičnih linij CHO

Celice oz. izvorna celična linija CHO je bila iz ovarijev samice kitajskega hrčka (*Cricetus griseus* ustvarjena) s spontano imortalizacijo izolirana v laboratoriju dr. T. Pucka leta 1957 (Puck in sod., 1958). Hrčka, ki živi v naravi, v puščavah severne Kitajske in Mongolije, je daroval dr. G. Yerganian z Bostonskega otroškega centra za proučevanje raka (Boston Children Cancer Research Foundation) (Puck, 1985). Čez približno deset let je dr. F. T. Kao iz izvorne celične linije CHO s kloniranjem ustvaril celično linijo CHO-K1 (Kao in Puck, 1968; Wurm, 2013). Izvorna celična linija CHO in CHO-K1 potrebujeata za svojo rast prisotnost prolina. Obe celični liniji sta bili darovani v številne laboratorije po svetu, pa tudi v ameriško zbirko celičnih linij ATCC (American Type Culture Collection). Celice CHO so bile v letih od 1957 do poznega leta 1970 zanimive predvsem za molekularne in klasične genetske študije (Wurm, 2013). Njihova priljubljenost je temeljila na njihovem preprostem gojenju v kulturi, majhnem številu kromosomov (11 parov) in tudi velikosti kromosomov (razmeroma veliki v primerjavi s človeškimi) ter posledično zaradi možnosti preproste izvedbe metabolnih in z mutacijami povezanih študij (Wurm, 2013).

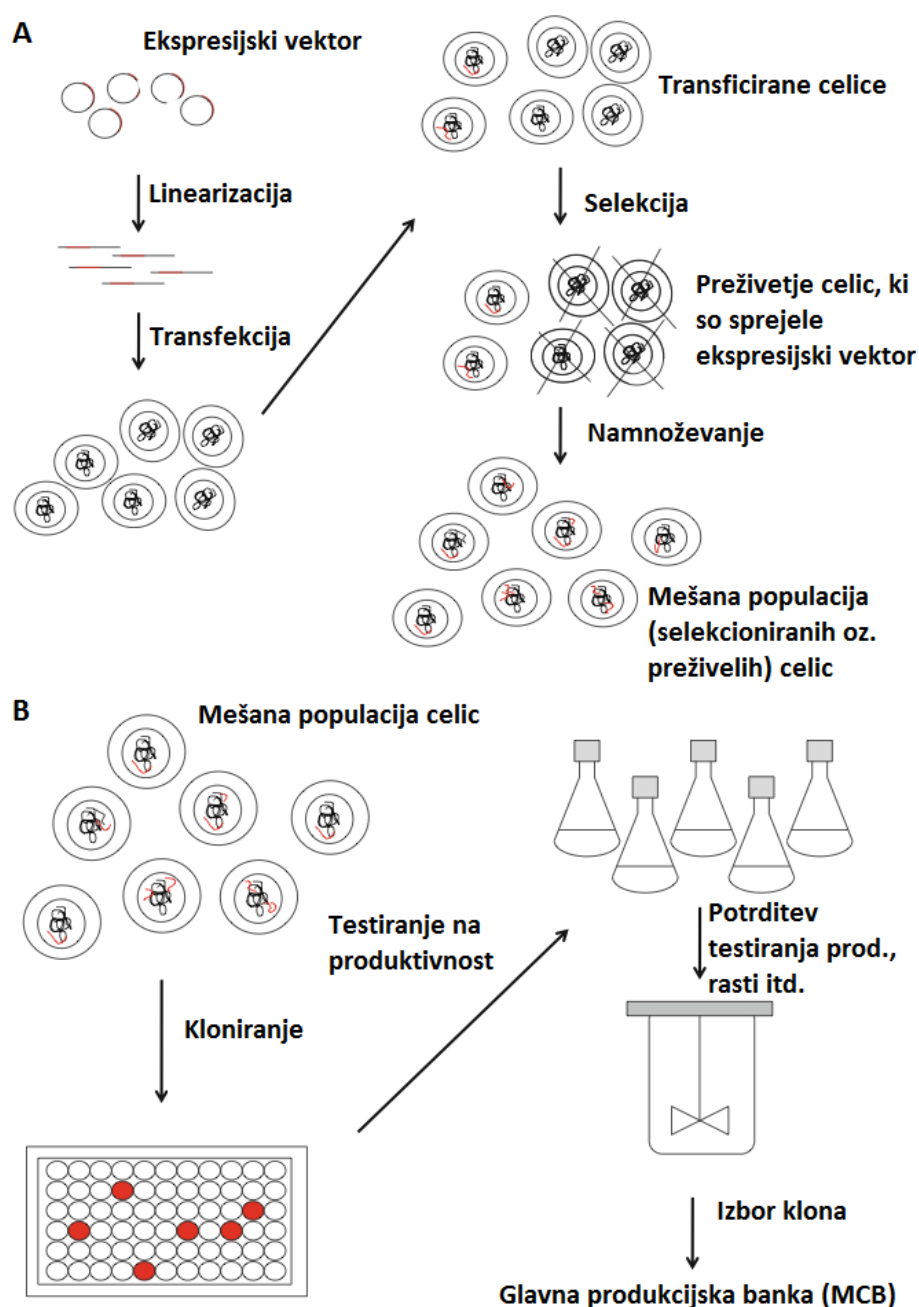
Naslednjo celično linijo z imenom CHO-DXB11 (tudi DUK-XB11) sta iz celic CHO-K1 ustvarila dr. G. Chasin in dr. L. A. Urlaub (Graf in Chasin, 1982; Urlaub in Chasin, 1980). Osredotočena sta bila predvsem na encim dihidrofolat reduktazo (DHFR). Želela sta onesposobiti njegovo aktivnost. Z mutagenozo (tretiranje z deoksiuridinom oz. etil metan sulfonatom – EMS in žarki gama) sta dosegla delecijo enega alela, na drugega pa vnesla nesmiselno mutacijo. Pri celični liniji CHO-DXB11 so občasno še vedno opazili zaznavno aktivnost DHFR (Wurm, 2013). Gandor in sod. (1995) poročajo o spontani reaktivaciji enega izmed alelov *DHFR* med adaptacijo celične linije na brezserumsko gojišče. Reaktivacijo razlagajo s tem, da je bil prvi alel onesposobljen z EMS, ki kot znani mutagen vpliva na zamenjave baz, drugi alel pa z obsevanjem z žarki gama, kar je najverjetneje povzročilo le reverzibilno okvaro (Gandor in sod., 1995).

Z namenom popolne onesposobitve tudi drugega alela *DHFR* sta dr. G. Chasin in dr. L. A. Urlaub delo nadaljevala. Poskusa tokrat nista začela s celicami CHO-K1, ampak s CHO pro3- in njenimi naslednicami CHO-MTX-RIII, ki izvirata neposredno iz izvirne celične linije CHO ter sta nastali z mutagenozo na osnovi EMS v laboratoriju dr. Flintoffa in dr. Siminovitcha (Flintoff in sod., 1976). Dr. G. Chasin in dr. L. A. Urlaub sta nadaljevala mutagenozo z žarki gama in uspešno dosegla popolno delecijo obeh alelov *DHFR*, ki sta bila na kromosomu 2. Novo celično linijo sta poimenovala CHO-DG44 (Urlaub in sod., 1983; Urlaub in sod., 1986).

Vse tri omenjene celične linije CHO (CHO-K1, CHO-DXB11 in CHO-DG44) so najpogostejše uporabljene celične linije za proizvodnjo terapevtskih rekombinantnih proteinov (Datta in sod., 2013; Jostock, 2011; Wurm, 2004).

2.1.2 Razvoj rekombinantnih celičnih linij CHO v farmacevtski industriji

Proizvodnja biofarmacevtskih učinkovin navadno temelji na razvoju rekombinantnih celičnih linij s stabilno integracijo gena za rekombinantni protein v genom sesalskih celic (Jostock, 2011). Shema razvoja rekombinantnih celičnih linij je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Pregled procesa razvoja rekombinantnih celičnih linij; (A) transfekcija in selekcija, (B) kloniranje in selekcija klonov (Jostock, 2011)

Figure 1: Overview of a typical recombinant cell line development process; (A) transfection and selection, (B) Single cell cloning and screening (Jostock, 2011)

V idealnem primeru poteka razvoj celičnih linij v kemijsko definiranem gojišču brez dodanih živalskih sestavin (Birch in Racher, 2006). Proces se začne z vnosom ekspresijskega vektorja, ki nosi zapis za rekombinantni protein v starševske celice, običajno s postopkom transfekcije (lipofekcija, elektroporacija itd.). Ko DNA enkrat vstopi v jedro, se naključno integrira v genom. Na izražanje transgena tako vsaj delno vpliva

okolica strukture kromosoma, kamor se je tuji gen vključil (Jayapal in sod., 2007). Sledita eden ali dva selekcijska koraka, ki omogočata obogatitev celic, ki so sprejele in v genom stabilno integrirale ekspresijski vektor in se v njih posledično izraža transgen (slika 1A). Odvisno od zapisa na ekspresijskem vektorju se običajno prvi korak selekcije izvede z antibiotikom, drugi pa z veliko koncentracijo metotreksata (0,5-1 μ M) (Jayapal in sod., 2007). Ta korak se imenuje tudi amplifikacija, ki občutno poveča selekcijski pritisk. Rezultat selekcije je t. i. mešana populacija celic (mpc, angl. pool), ki vsebuje celice z različnimi integracijskimi mesti in številom kopij transgena ter tudi različnimi produktivnostmi. S postopkom kloniranja se izolira posamezne celice oz. klone z najvišjo produktivnostjo, dobrimi rastnimi lastnostmi in tudi najboljšo kakovostjo produkta. Kloniranje se navadno izvede s postopnim redčenjem kulture do posameznih celic (angl. limiting dilution) v mikrotitrskih ploščicah, z uporabo pretočne citometrije s sortiranjem (angl. fluorescence activated cell sorting – FACS) ali z uporabo tehnologije ClonePix FL (Jostock, 2011). Ta temelji na nacepiti celic v nizki nacepitveni gostoti v poltrdno gojišče, kjer se iz posameznih celic oblikujejo kolonije. Ob nacepiti se v gojišče lahko doda tudi fluorescentno označena protitelesa, ki so usmerjena proti produktu, ki ga izločajo celice. Zaradi viskozne narave poltrdnega gojišča ostane produkt v neposredni bližini kolonij, kar omogoča zgodnje ločevanje klonov glede produktivnosti. Pogosto velja, da višja kot je intenziteta fluorescence kolonij, višja naj bi bila produktivnost izbranega klona. ClonePix FL je robot, ki na podlagi slikanja in parametrov, ki jih je nastavil uporabnik (velikost kolonij, okroglost, bližina sosednjih kolonij itd.), prenese izbrane kolonije v tekoče gojišče v mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami. Iz mikrotitrskih ploščic se klone prenašajo v višje volumne do stresalnih platenk.

Neodvisno od tehnologije kloniranja se glede na produktivnost navadno ovrednoti veliko število klonov (vsaj 100 in več), iz katerih se izbere nekaj kandidatov (10–30), ki predstavljajo ožji izbor za končno rekombinantno produkcijsko celično linijo (Jayapal in sod., 2007). Izbrane klone se ovrednoti glede na njihove rastne lastnosti, stabilnost produkcije, ustreznosti razvoja v bioreaktorjih in oceno kakovosti produkta (slika 1B).

Na koncu se končni klon shrani v obliki osnovne produkcijske banke (angl. master cell bank – MCB), ki se jo obsežno testira na prisotnost različnih mikroorganizmov (virusi, bakterije, mikoplazme itd). Iz celične banke MCB se v namen dolgotrajne zaloge lahko pripravi večje število delovnih celičnih bank (angl. working cell bank – WCB) (Jostock, 2011). Končna produkcijska celična linija, shranjena v obliki celičnih bank v pogojih dobre proizvodne prakse (angl. good manufacturing practice – GMP), se nato uporabi za pripravo materiala za klinične študije. Če so te uspešne, pa tudi za nadaljnjo proizvodnjo produkta (Jayapal in sod., 2007).

2.1.3 Selekcijski sistemi

Selekcijski označevalni geni so ključni elementi, zapisani na ekspresijskem vektorju, ki so odgovorni za stabilno izražanje transgena (Jostock, 2011). Na voljo so različni selekcijski

geni, učinkovitost njihovega delovanja pa je odvisna tudi od lastnosti gostiteljskih celic (Jostock, 2011).

Ena skupina selekcijskih sistemov temelji na genih, ki zagotavljajo odpornost proti antibiotikom, kot so geneticin (G418)/neomicin, puromicin, higromicin in zeocin. Selekcijski geni so navadno mikrobnega izvora in nosijo zapis za encime, ki deaktivirajo antibiotik. Posledično celice CHO, ki niso sprejele ekspresijskega vektorja z zapisom za tak selekcijski gen in tudi ne izražajo transgena, v prisotnosti antibiotika hitro propadejo. Slabost omenjenega sistema je, da ne omogoča amplifikacije transgena, pa tudi, da lahko zelo zvišano izražanje selekcijskega gena v mešani populaciji celic vodi v hitro inaktivacijo antibiotika ter posledično preživetje tudi celic, ki ne izražajo selekcijskega gena in transgena (Jostock, 2011).

Druga skupina metabolnih selekcijskih sistemov temelji na zapisu za encim dihidrofolat reduktazo (DHFR) ali glutamin sintetazo (GS) (Birch in Racher, 2006; Cacciatore in sod., 2010). DHFR katalizira nastanek folatov, ki so ključni metaboliti za sintezo nukleotidov in posledično DNA, medtem ko je GS odgovorna za sintezo esencialne aminokisline glutamina iz glutamata (Birch in Racher, 2006; Cacciatore in sod., 2010). Selekcijski pritisk se lahko še poveča z dodatkom inhibitorjev encimov: metotreksata (MTX), ki inhibira DHFR, ali metionin-sulfoksimida (MSX), ki inhibira GS (Jostock, 2011). Z uporabo velikih koncentracij inhibitorjev je sistem uporaben tudi pri celicah, ki sicer endogeno izražajo encim DHFR ali GS (Jostock, 2011). Da celice preživijo selekcijo z dodatkom inhibitorja v gojišče, močno povečajo izražanje gena za encim z namnoževanjem genske kopije v genomu (amplifikacija). Ker pa je t. i. amplifikacijska enota precej večja (100–3000 kb), kot je velikost gena *DHFR*, se močno poveča tudi izražanje transgena, ki je na ekspresijskem vektorju in nato v genomu v neposredni bližini selekcijskega gena (Kaufman, 1990; Kaufman in sod., 1983).

2.1.4 Število kopij transgenov, raven izražanja in vpliv na produktivnost

Visoko število kopij transgena, ki je rezultat amplifikacije, še ne pomeni tudi visoke produktivnosti, kar je najverjetneje rezultat transkripcijskih in posttranskripcijskih omejitev pri klonih z zelo visoko amplifikacijo (Kim in sod., 1998; Lattenmayer in sod., 2007; Reisinger in sod., 2008). Možno je tudi, da vzrok za zmanjšano produktivnost ni nujno omejen na genetsko raven (Edros in sod., 2013). Amplifikacija in zelo visoka stopnja izražanja tujih genov lahko za celico predstavlja bolj ali manj toksično metabolno breme (Chusainow in sod., 2009). Vzrok za odsotnost korelacije med številom kopij transgena in produktivnostjo so lahko tudi prerazporeditve kromosomov (translokacije in homologne rekombinacije), ki so del procesa nastanka rekombinantnih celičnih linij (Chusainow in sod., 2009). Med postopkom kromosomskih prerazporeditev se transgen lahko vključi v heterokromatin ali blizu njega, kar lahko povzroči njegovo inaktivacijo (Wilson in sod., 1990).

Številne raziskovalne skupine (Barnes in sod., 2004; Dorai in sod., 2006; Edros in sod., 2013; Fann in sod., 1999; Khoo in Al-Rubeai, 2009; Lee in sod., 2009; Lee in Lee, 2000; O'Callaghan in sod., 2010) so ugotovile, da je visoka produktivnost tesno povezana z visoko ravno transkriptov za rekombinantni protein, medtem ko drugi (Flickinger in sod., 1992; Leno in sod., 1992; Reisinger in sod., 2008; Smales in sod., 2004) močne korelacije med ravno izražanja transgena in produktivnostjo niso opazili. Smales in sod. (2014) so domnevali, da se vzrok za odsotnost korelacije skriva v okvarjenem ali omejenem izločevalnem sistemu med procesom zvijanja in sestavljanja proteinov znotraj endoplazmatskega retikuluma. Nekateri avtorji (Dorai in sod., 2006; Lee in sod., 2009; McLeod in sod., 2011; Vishwanathan in sod., 2014) so opazili močnejšo korelacijo med produktivnostjo in ravno izražanja le pri težki verigi, spet drugi (Borth in sod., 1999; Merten in sod., 1994; Strutzenberger in sod., 1999) pa ravno nasprotno – močnejšo korelacijo med produktivnostjo in količino mRNA pri lahki verigi. O'Callaghan in sod. (2010) so zaključili, da so lahko nedoslednosti pri korelaciji med produktivnostjo in količino transkriptov transgena posledica uporabe specifičnih celičnih linij in/ali različnih sistemov izražanja.

V številnih študijah so opazili tudi, da je razmerje med lahko in težko verige IgG navadno večje od 1, tako pri transkriptu kot pri proteinu (Bibila in Flickinger, 1991; Edros in sod., 2013; Li in sod., 2007; O'Callaghan in sod., 2010; Schlatter in sod., 2005; Vishwanathan in sod., 2014). Vishwanathan in sod. (2014) so pri visoko producirajočih klonih opazili manjše presežke v izražanju lahke verige, medtem ko je bilo pri nizko producirajočih klonih razmerje med lahko in težko verigo navadno večje od 1,5.

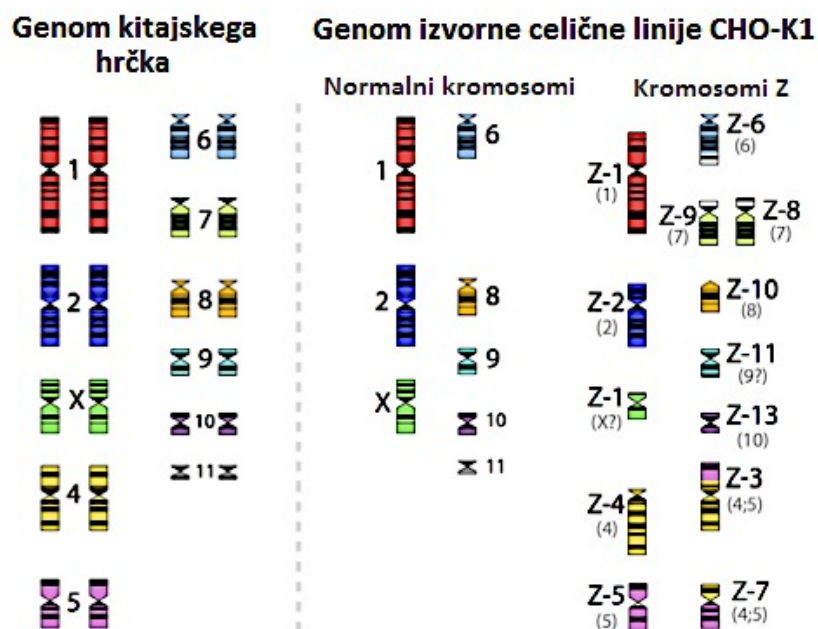
Znižana produktivnost je lahko tudi rezultat počasnega izločanja proteinov iz celice (O'Callaghan in sod., 2010). Preobremenjenost izločevalnih poti predstavlja mogoče ozko grlo v procesu učinkovitega potovanja proteinov iz celice. S čezmernim izražanjem določenih genov (*SNARE*, *SNAP-23*, *VAMP8* in *Munc18b*), katerih produkt so proteini, ki so del izločevalnega sistema, so povečali izločanje in posledično tudi produktivnost rekombinantnih celičnih linij (Peng in sod., 2011; Peng in sod., 2010). Celice z okrnjenimi izločevalnimi sposobnostmi lahko kopičijo velike količine intracelularnega rekombinantnega proteina, kar je za celico toksično in bi najverjetneje vodilo v celično smrt (Vishwanathan in sod., 2014). Le tiste celice, ki so razvile sistem visoke produkcije rekombinantnih proteinov in tudi učinkovitega izločanja proteinov iz celice, so sposobne preživetja (Vishwanathan in sod., 2014).

2.1.5 Kariotip

Kariotip je število in izgled kromosomov v evkariontskih celicah. Pri analizi kariotipa se določijo velikost oz. dolžina kromosomov, pozicija centromere na kromosomu, vzorci barvanja, morebitne razlike v spolnih kromosomih in druge fizične nepravilnosti. Kromosomi so najbolj vidni v fazi rasti mitoze (Moore in Best, 2001), na čemer temeljijo skoraj vse metode za analizo kromosomov (Bickmore, 2001). Najpogosteje uporabljene

klasične citogenetske metode barvanja kromosomov so: barvanje po Giemsi (obarvajo se proge G), barvanje s kvinakrinom (obarvajo se proge Q), barvanje prog C (obarvajo se centromerne regije) in barvanje prog T (obarvajo se telomerne regije) (Bickmore, 2001; Moore in Best, 2001). Pri barvanju z barvilom Giemsa se obarvajo proge G, ki vsebujejo velik delež baz A-T in manj genov ter se podvojijo pozneje. V svetlih progah je velik delež nukleotidov G-C, kar predstavlja regije z največ geni, ki se tudi najprej podvojijo (Moore in Best, 2001). Čeprav je vzorce, pridobljene na kromosomih s klasičnimi metodami, po barvanju včasih težko interpretirati (Cao in sod., 2012), je pri celicah CHO najpogosteje uporabljena metoda za analizo kariotipov barvanje po Giemsi (Deaven in Petersen, 1973; Derouazi in sod., 2006; Worton in sod., 1977; Wurm, 2013).

Citogenetske študije zadnjih 40 let so pri različnih celičnih linijah CHO, ki so se razvijale v različnih laboratorijih po svetu, pokazale precejšnjo genomsko heterogenost (Wurm in Hacker, 2011). Prve podrobne analize kariotipov celic CHO segajo v leto 1973 in so temeljile na barvanju z Giesma (Deaven in Petersen, 1973), ki se precej uporablja še zdaj. Slika 2 prikazuje 22 kromosomov, ki so jih našli pri kitajskem hrčku (10 avtosomskih parov kromosomov in 2 spolna kromosoma), medtem ko je bil kariotip izvirne celične linije CHO-K1 že zelo spremenjen (Deaven in Petersen, 1973). Pri zadnjem so našli le 8 kromosomov, ki so ustrezali normalnim kromosomom kitajskega hrčka, preostalih 13 pa so poimenovali kromosomi Z (slika 2). Ti so vsebovali številne delecije, translokacije ali prerazporeditve (Deaven in Petersen, 1973).



Slika 2: 22 kromosomov kitajskega hrčka (levo) in 21 kromosomov izvirne celične linije CHO-K1 (desno), pridobljenih z barvanjem po Giemsi (Wurm, 2013)

Figure 2: 22 chromosomes of the Chinese hamster (left) and 21 chromosomes of the CHO-K1 ancestral cell line (right) as identified by G-banding with Giemsa stain (Wurm, 2013)

Kromosomska heterogenost je pogosto opažena tudi pri celicah, ki so monoklonalne (Wurm in Hacker, 2011). Pri izvorni celični liniji CHO-K1 je bilo pri približno 24 % vseh analiziranih celic oz. metafaz število kromosomov različno od 21, kot na primer 19, 20, 22 ali celo 44 kromosomov (Deaven in Petersen, 1973). Tudi Kao in Puck sta leta 1970 pri celični liniji CHO-K1 poročala o modalnem številu kromosomov 20, kar pomeni, da je število kromosomov v metafazah lahko različno s povprečjem 20 (Kao in Puck, 1970).

Analiza kariotipa starševske celične linije CHO-DG44 je prav tako pokazala povprečno število 20 kromosomov v večini pregledanih celic (Derouazi in sod., 2006). Od tega je bilo le 7 takih, ki so ustrezali normalnim kromosomom kitajskega hrčka, 4 kromosomi Z in 9 t. i. derivatnih kromosomov (Derouazi in sod., 2006). Zadnje so definirali kot strukturno preoblikovane kromosome, ki so nastali z eno ali več prerazporeditvami znotraj enega ali več kromosomov (Derouazi in sod., 2006). Pri 30–40 % producirajočih rekombinantnih celičnih linij CHO-DG44 oz. klonih je bil kariotip enak opisanemu, pri preostalih pa je bil kariotip zaradi kromosomskih prerazporeditev vidno spremenjen (Derouazi in sod., 2006).

Podobne rezultate so opazili tudi Cao in sod. (2012), ki so z uporabo knjižnice umetnih bakterijskih kromosomov (angl. bacterial artificial chromosome – BAC) in analize BAC FISH sestavili in primerjali kariotipe za celice kitajskega hrčka ter celični liniji CHO-K1 in CHO-DG44. Kot že drugi avtorji so ugotovili podobno, da je izmed povprečno prešteti 20 kromosomov pri obeh celičnih linijah približno 8 ohranjenih in enakih kromosomov kot pri kitajskem hrčku (Cao in sod., 2012). Prav tako poročajo o široki heterogenosti kariotipov znotraj posameznih klonov, ki je očitno značilna lastnost genoma celic CHO (Cao in sod., 2012). Znano je tudi, da je genom celic CHO nestabilen, saj se med razvojem starševskih in tudi rekombinantnih celičnih linij v genomu odvijajo številne prerazporeditve (Cao in sod., 2012; Worton in sod., 1977) zaradi mutageneze, adaptacije na brezserumsko gojišče, amplifikacije genov, dolgotrajnega gojenja v selekcijskih pogojih in drugih razlogov (Cao in sod., 2012).

2.2 UPORABA TEHNOLOGIJ '-OMIK' PRI KARAKTERIZACIJI CELIC CHO

Z razvojem različnih tehnologij "-omik" so bile določene celice CHO analizirane z različnih vidikov, kar vključuje specifične poskuse in s tem povezane podatke iz genomike, transkriptomike, metabolomike, proteomike, glikomike (Datta v sod., 2013) in tudi fluksomike (Kildegaard in sod., 2013). Študije s področja genomike in transkriptomike so podrobneje opisane v poglavjih 2.2.1 in 2.2.2.

2.2.1 Genom celic CHO

Razvoj visokozmogljivih tehnologij sekvenciranja naslednje generacije (NGS) je pospešil razvoj genomike, kar se kaže tudi v številu objavljenih sesalskih genomov (Brinkrolf in sod., 2013). Pomemben mejnik v svetu sistemske biologije celic CHO je objava prvega javno dostopnega genoma izvorne celične linije CHO-K1 (Xu in sod., 2011). Genom so

sekvencirali s pristopom 'de novo' in sestavili s programom SOAPdenovo (angl. short oligonucleotide analysis package). Ugotovili so, da ima izvorna celična linija CHO-K1 genom velik 4,45 Gb in določili 24383 genov. Posebej so se posvetili genom, ki so odgovorni za glikozilacijo, in genom, ki so odgovorni za dovzetnost okužbe z virusi. Izmed genov, odgovornih za glikozilacijo, so pri 99 % našli ortologe pri človeku. Vendar se polovica (približno 141 genov) ni izražala v eksponentni fazi rasti celične linije CHO-K1. Prav tako so potrdili odsotnost izražanja večine genov, ki so pri človeku odgovorni za vstop virusov v celice, kar razloži tudi odpornost celic CHO proti velikemu številu človeških virusov.

Čez dve leti so s podatki o genomu samice kitajskega hrčka in tudi šestih celičnih linij postregli Lewis in sod. (2013). Vzorce DNA iz različnih tkiv kitajskega hrčka so sekvencirali s tehnologijo NGS (Illumina HiSeq 2000) in posamezna branja sestavili s programom SOAPdenovo. Poročajo o 2,4 Gb velikem genomu kitajskega hrčka in 24404 pripadajočih genih. Rezultate so primerjali s prvim genomom celične linije CHO-K1 (Xu in sod., 2011) in kljub velikemu številu strukturnih razlik (25711 indel) povzeli, da sta si po številu anotiranih genov in z 99 % prekrivanjem analizirana genoma zelo podobna. Dodatno so sekvencirali genome šestih celičnih linij, ki izhajajo iz treh zgodovinsko različnih vej (CHO-K1, CHO-DG44 in CHO-S), in jih primerjali z genomom kitajskega hrčka. Ugotovili so, da številni geni, ki so v genomu kitajskega hrčka, manjkajo v različnih celičnih linijah. Dodatno so zaznali več kot 3,7 milijona polimorfizmov posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism – SNP), 551240 vključitev ali izbrisov (indel) in 7063 različic v številu kopij (angl. copy number variation – CNV). Veliko zaznanih mutacij je bilo v genih, ki so pomembni za razvoj bioprosesov, kot npr. apoptotskih genih.

Tretji genom celic CHO je predstavila skupina, ki je sekvencirala kromosome, izolirane s pretočnim citometrom s sortiranjem (Brinkrolf in sod., 2013). Analizirali so t. i. celično linijo CHO 17A/GY. Posamezne kromosome so sekvencirali z uporabo naprave za določanje zaporedja Illumina in sestavili s kartiranjem zaporedij na mišji genom in že znani genom CHO-K1. Opazili so, da kljub obsežnim kromosomskim prerazporeditvam, ki so se zgodile v celični liniji CHO-K1 (Cao in sod., 2012; Derouazi in sod., 2006), pravzaprav ne manjka noben glavni del genoma. Vrzeli v genomu celične linije CHO-K1 glede na mišji genom se pojavijo na enakih mestih, ki so bogata z visoko repetitivnimi zaporedji, in pri genomu kitajskega hrčka. Pri celični liniji CHO-K1 zares manjkajo zelo majhne regije, ki so drugače v genomu kitajskega hrčka.

2.2.2 Transkriptom celic CHO

2.2.2.1 Tehnologije transkripcijskega profiliranja

Transkriptom je celoten nabor transkriptov oz. molekul RNA, ki jih proizvedejo ena celica, populacija celic ali celotni organizem v kateremkoli določenem času, in predstavlja glavno

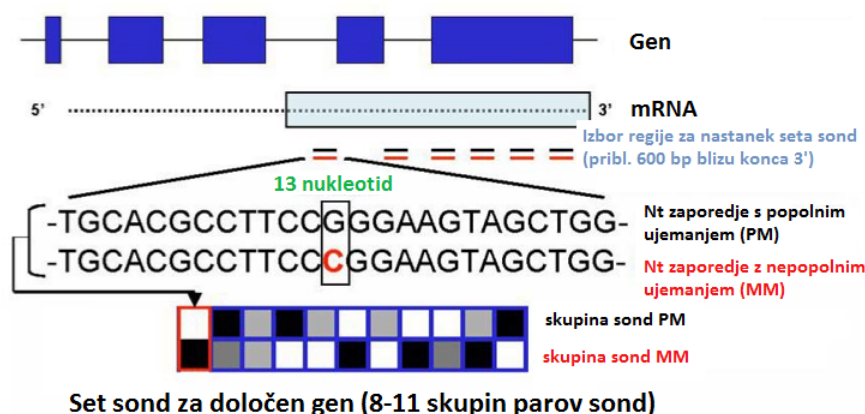
povezavo med informacijo, ki je kodirana v DNA, in fenotipom (Malone in Oliver, 2011). Velikost transkriptoma pri celicah CHO so ocenili na več kot 29000 transkriptov (Becker in sod., 2011; Xu in sod., 2011). Za analizo transkriptoma oz. transkripcijsko profiliranje se lahko uporabljajo: metodi, kot sta prenos po Northernu in RT-qPCR, označevalci izraženega zaporedja (angl. expressed sequence tags – EST), zaporedna analiza izražanja genov (angl. serial analysis of gene expression – SAGE), tehnologiji mikromrež in NGS (Malone in Oliver, 2011).

2.2.2.1.1 Mikromreže

Mikromreže so sestavljene iz kratkih odsekov DNA, ki so nanese kot točke na točno določeno mesto na nosilcu in vsebujejo zaporedje nukleotidov z različnih delov genoma. Izraz mikromreže se je uveljavil zaradi značilnega videza nanese DNA v obliki natisnjenih točk, ki po videzu tvorijo mrežo. Na voljo so številne komercialne mikromreže (predvsem za analizo izražanja genov pri človeku), pogosto pa izdelajo tudi mikromreže po naročilu.

Med najpogostejše uporabljenimi mikromrežami za analizo transkriptoma celic CHO so mikromreže proizvajalcev Affymetrix (Charaniya in sod., 2008; Clarke in sod., 2011a; Clarke in sod., 2011b; Doolan in sod., 2012; Doolan in sod., 2010; Doolan in sod., 2008; Kang in sod., 2014; Kantardjieff in sod., 2010; Schaub in sod., 2010; Shen in Sharfstein, 2006; Shen in sod., 2010; Vishwanathan in sod., 2014; Yee in sod., 2008; Yee in sod., 2009) ter tudi Agilent (Becker in sod., 2014; Hernandez Bort in sod., 2012; Klausning in sod., 2011; Trummer in sod., 2008). Med izvajanjem našega poskusa komercialno dostopnih mikromrež CHO ni bilo na voljo, študije pa so bile izvedene večinoma na mikromrežah, izdelanih po naročilu, ali pa tudi na komercialno dostopnih mišjih mikromrežah.

Affymetrix za proizvodnjo mikromrež uporablja tehnologijo fotolitografije, s katero na nosilec neposredno sintetizira 25 bp dolga oligonukleotidna zaporedja (Dalma-Weiszhausz in sod., 2006; Lockhart in sod., 1996). Določen gen oz. transkript je na mikromreži zastopan s t. i. seti sond, znotraj katerih je več skupin 25 bp dolgih oligonukleotidnih zaporedij. Ta so zasnovana tako, da pokrivajo približno 600 bp dolgo regijo gena na njegovem koncu 3' (slika 3) (Dalma-Weiszhausz in sod., 2006). Znotraj seta sond je 11 skupin nukleotidnih zaporedij s popolnim ujemanjem (angl. perfect match – PM) ter 11 skupin nukleotidnih zaporedij z nepopolnim ujemanjem (angl. miss match – MM). Nukleotidna zaporedja z nepopolnim ujemanjem so identična tistim s popolnim ujemanjem, le da imajo spremenjen srednji, 13. nukleotid. Znotraj seta sond, ki je specifičen za en transkript, je torej 22 skupin različnih zaporedij (Dalma-Weiszhausz in sod., 2006). Nukleotidna zaporedja z nepopolnim ujemanjem služijo kot negativne kontrole, ki omogočajo identifikacijo nespecifičnih hibridizacij (Miller in Tang, 2009).



Slika 3: Shema načrtovanja sond na mikromrežah proizvajalca Affymetrix (Kantardjiev, 2009)
Figure 3: Overview of Affymetrix microarray probe design (Kantardjiev, 2009)

Na eno mikromrežo proizvajalca Affymetrix se hibridizira en vzorec. Poskus se začne z izolacijo celokupne RNA ali mRNA, ki se nato z obratnim prepisom prepíše v cDNA. Ta se potem v prisotnosti biotiniziranih ribonukleotidov nadalje prepíše v z biotinom označeno aRNA (tudi cRNA). Na mikromreže se hibridizira fragmentirane in z biotinom označene molekule aRNA. Po hibridizaciji se mikromreže barva s streptavidinom, ki omogoča fluorescentno opazovanje vezanih transkriptov.

Mikromreže proizvajalca Agilent imajo na nosilec vezana daljša oligonukleotidna zaporedja (60–100 bp), ki posledično obljublajo višjo specifičnost hibridizacije (Miller in Tang, 2009). V nasprotju s tehnologijo Affymetrix omogočajo poleg enobarvne tudi večbarvno hibridizacijo ter posledično nanos dveh vzorcev na eno mikromrežo (Miller in Tang, 2009).

2.2.2.1.2 PCR v realnem času (qPCR)

Metoda RT-qPCR je kombinacija obratnega prepisovanja (angl. reverse transcription – RT) in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Metodo RT-qPCR pogosto uporabljamo za detekcijo in kvantifikacijo mRNA v vzorcih tkiv in celic na različnih področjih. RT-qPCR se zelo pogosto uporablja za analizo izražanja genov in validacijo oz. potrditev rezultatov izražanja genov, pridobljenih z mikromrežami (Morey in sod., 2006).

Metoda RT-qPCR temelji na sintezi cDNA iz molekul RNA (celokupne RNA ali mRNA) s postopkom obratnega prepisovanja, amplifikaciji specifičnih molekul cDNA ter detekciji in kvantifikaciji cDNA s qPCR (Gibson in sod., 1996).

2.2.2.1.3 Sekvenciranje RNA

Nedavni razvoj tehnologij NGS je omogočil ne le analizo genomov, ampak tudi analizo transkriptomov ali t. i. sekvenciranje RNA (angl. RNA-seq) (Martin in Wang, 2011). V

nasprotju s tehnologijo mikromrež v primeru sekvenciranja RNA predhodno znanje o nukleotidnem zaporedju ni potrebno, predstavlja pa pravilno sestavljanje kratkih odčitkov obsežen informacijski zalogaj (Martin in Wang, 2011). Tehnologija sekvenciranja RNA je še posebej uporabna pri natančnem proučevanju transkriptoma, npr. detekciji izražanja specifičnih alelov in tudi proučevanju spojitvenih mest (angl. splice junctions) (Malone in Oliver, 2011).

Trenutno prevladujejo naslednje metode NGS: sekvenciranje s sintezo na kroglicah na pikotitrski ploščici na sistemu 454 (Roche), sekvenciranje s sintezo na pretočni celici na napravah podjetja Illumina, sekvenciranje z ligacijo na kroglicah na napravi SOLid (Applied Biosystems) ter sekvenciranje s sintezo na kroglicah na čipu Ion na napravi Ion Torrent (Life Technologies).

2.2.2.2 Transkriptom celic CHO

Skoraj vse celice večceličnega organizma vsebujejo v genomu enako nukleotidno zaporedje. Vendar pa so glede na funkcijo in tip celice geni različno izraženi, kar se kaže tudi v specifičnih vzorcih izražanja oz. ekspresijskih profilih. Ker celice CHO izvirajo iz ovarijev kitajskega hrčka, bodo imele svoj edinstven set genov, ki se izražajo ali pa se ne. Poleg tega so pri celicah CHO, kot pri preostalih evkariontskih celicah, kromosomi sestavljeni iz intronov in eksonov. Ker informacija, ki potuje od primarnega transkripta do zrele mRNA, vključuje spajanje eksonov, ki je pogosto podvrženo tudi alternativnim spojitvenim mestom, lahko iz istega gena nastane več različnih proteinov. Sekvenciranje genoma resda predstavlja poglobljen vpogled v sestavo celice, vendar je od analize transkriptoma pričakovati dodatno in morda celo bolj informativno sliko celične fiziologije (Datta in sod., 2013).

Številni avtorji so se v svojih študijah osredotočili na analizo transkriptoma pri celicah CHO, ki so jih izpostavili stresnim pogojem, kot so nizka temperatura gojenja, dodatku natrijevega butirata, ali pa so celice izpostavili hiperosmotskemu šoku. Za vse omenjene pogoje je znano, da lahko pozitivno vplivajo na produktivnost celic CHO.

V različnih študijah (Baik in sod., 2006; Kantardjieff in sod., 2010; Yee in sod., 2009), pri katerih so proučevali vpliv gojenja celic CHO pri nizki temperaturi (33 °C) na povišanje produktivnosti rekombinantnih protiteles, so našli nekatere različno izražene gene, ki bi lahko bili povezani s produktivnostjo. Yee in sod. (2009) so s primerjalno analizo transkriptoma ugotovili, da na zvišanje produktivnosti najverjetneje vplivajo geni, ki so vključeni pri procesih nastajanja veziklov, odgovornih za izločanje, endocitozi in urejanju citoskeleta. Baik in sod. (2006) so analizo transkriptoma z mikromrežami dopolnili še z analizo proteoma ter našli 10 genov s povišanim ali znižanim izražanjem pri temperaturi 33 °C oz. običajni temperaturi 37 °C. Kantardjieff in sod. (2010) so proučevali vpliv znižanja temperature v kombinaciji z dodatkom natrijevega butirata in ugotovili, da se

produktivnost v omenjenih pogojih poviša predvsem zaradi povišane zmogljivosti izločanja celic, in ne toliko zaradi krajših zadrževalnih časov proteinov na tej poti.

Podobno kot vpliv temperature so mnogi (Gatti in sod., 2007; Kantardjieff in sod., 2010; Klausning in sod., 2011; Yee in sod., 2008) proučevali vpliv dodatka natrijevega butirata, ki deluje kot inhibitor histonske deacetilaze, kar olajša odpiranje kromatina ter posledično dostop transkripcijskim faktorjem (Riggs in sod., 1977). Yee in sod. (2008), (Kantardjieff in sod., 2010; Yee in sod., 2009) so pri visoko producirajočih celicah CHO poročali o povišanem izražanju genov, odgovornih za procesiranje proteinov in izločanje, pa tudi za potencial redoks. Podobno so ugotovili Klausning in sod. (2011), in sicer, da pri višji produktivnosti sodelujejo predvsem geni, vključeni v metabolizem ogljikovih hidratov, celični cikel in prenos signalov.

Kot ekonomska rešitev za povišanje produktivnosti se je izkazal tudi hiperosmotski stres oz. dodatek soli ali sladkorjev v gojišče celic CHO. Avtorji (Ryu in sod., 2000; Shen in Sharfstein, 2006; Shen in sod., 2010), ki so izvedli primerjalne analize transkriptoma v takih pogojih, poročajo o dodatnih genih, ki imajo zvišano/znižano izražanje v pogojih hiperosmotskega stresa.

Clarke in sod. (2011) so na podlagi nabora podatkov, ki je zaobjemal analizo transkriptoma celic v bioreaktorju v stacionarni fazi rasti, celic gojenih pri nižji temperaturi, ter visoko in nizko producirajočih celičnih linij predstavili model za napoved specifične produktivnosti. Doolan in sod. (2010, 2013) so z mikromrežami proučevali vpliv na celično rast ter identificirali več kot 400 genov z zvišanim oz. znižanim izražanjem pri hitro rastočih celicah.

Večina drugih člankov (Charaniya in sod., 2008; Clarke in sod., 2011a; Doolan in sod., 2012; Doolan in sod., 2008; Kang in sod., 2014; Nissom in sod., 2006; Schaub in sod., 2010; Trummer in sod., 2008; Vishwanathan in sod., 2014) opisuje bolj ali manj podoben pristop analize transkriptoma sesalskih celic v povezavi z visoko produktivnostjo, včasih tudi v kombinaciji z analizo proteoma. Trummer in sod. (2008) so na ravni transkriptoma produktivnosti raziskovali tudi zmogljivosti sialilacije ter odpornost proti stresu v procesu razvoja rekombinantnih celičnih linij. Prepoznali so potencialne označevalne gene, s katerimi v zgodnjih fazah razvoja rekombinantnih celičnih linij lahko napovedo občutljivost za stres. Dodatno so našli seznam genov, ki bi lahko napovedovali visoko produktivnost. So pa ugotovili tudi, da je za potrditev specifičnosti naštetih genov potrebna ponovitev poskusa na večjem številu vzorcev. Charaniya in sod. (2008) poročajo o verjetnosti, da so pri visoki produktivnosti udeležene vsaj še skupine genov, povezane z ribosomalnim delovanjem mitohondrijev, citoskeletom in tudi z regulacijo celičnega cikla. Kang in sod. (2014) so z analizo transkriptoma in proteoma iskali in tudi identificirali gene, povezane s fenotipi kot so visoka produktivnost, hitra rast in celična velikost. Na podlagi rezultatov so povzeli še, da je produktivnost verjetno manjša in težje zaznavna lastnost kot rast in velikost celic v pomenu proučevanja globalne slike transkriptoma.

Nissom in sod. (2006) so ugotovili, da je 20 % genov in 45 % proteinov različno izraženih pri primerjavi visoko in nizko producirajočih celic CHO. Dodatno so pri visoko producirajočih celicah CHO zaznali zvišano izražanje genov, ki so vključeni v sproščanje kromatina, ter tudi genov in proteinov, ki spodbujajo celično rast in znižano izražanje genov, ki so vključeni v zgoščevanje kromatina, pa tudi genov in proteinov, ki zavirajo celično rast. Clarke in sod. (2011) so s posebnim pristopom statistične analize WGCNA (angl. weighted gene coexpression network analysis) gene razvrstili v skupine in jih povezali z bioprocenimi spremenljivkami, s celično rastjo in tudi produktivnostjo.

V primerjavi s študijami transkriptoma z mikromrežami je analiz na področju sekvenciranja RNA za zdaj še bolj malo. V študijah sekvenciranja RNA celic CHO so se večinoma ukvarjali z analizo pridobljenih sekvenc, ki so jih kartirali na zaporedja iz različnih javno dostopnih baz (Becker in sod., 2011; Hammond in sod., 2011; Jacob in sod., 2010) oz. so podatke uporabili za izboljšanje anotiranosti hrčkovih genov (Lewis in sod., 2013; Xu in sod., 2011). V nobeni izmed do zdaj znanih študij sekvenciranja RNA se niso osredotočili na analizo produktivnosti celic CHO.

2.3 CELIČNI INŽENIRING

Klasične metode genetskega inženiringa, ki se precej uporabljajo zadnji dve desetletji, vključujejo (1) identifikacijo gena, ki ga želimo izraziti v gostiteljskih celicah, (2) zasnovanje ekspresijskega vektorja in optimizacijo nukleotidnega zaporedja za izražanje v celicah CHO, (3) molekulska kloniranje transgena v ekspresijski vektor, (4) transfekcijo in optimizacijo integracijskega mesta v gostiteljski genom, (5) optimizacijo izražanja s postopkom amplifikacije ter (6) izbor ustreznih in visoko produktivnih klonov (Datta in sod., 2013).

Poleg klasičnih metod se pri celicah CHO čedalje pogosteje uporablja celični inženiring, ki vključuje optimizacijo celičnih procesov z namenom ustvariti bolj robustne bioprocese in tudi visoko produktivne celične linije (Datta in sod., 2013). V dosedanjih raziskavah so razvili npr. celice CHO, ki so odporne proti apoptozi (Dorai in sod., 2010; Dorai in sod., 2009; Majors in sod., 2009), imajo zmanjšano produkcijo laktata (Jeon in sod., 2011; Zhou in sod., 2011) ali pa izboljšane glikozilacijske profile (Jeon in sod., 2011; Majors in sod., 2009; Mohan in sod., 2008; Son in sod., 2011; Zhou in sod., 2011). Omenjene celične procese je mogoče spreminjati z različnimi mehanizmi, na primer z utišanjem genov, s čezmernim izražanjem posameznih genov ali s spreminjanjem izražanja večje skupine genov z uporabo mikroRNA (miRNA) (Datta in sod., 2013).

Pristop utišanja genov vključuje interferenčne RNA (RNAi) in ciljano spreminjanje določenih genov, kar pogosto temelji na uporabi nukleaz (Datta in sod., 2013). S tehnologijo RNAi so poskušali utišati različne gene, ki so posredno odgovorni za produktivnost ali kakovost rekombinantnih proteinov (Wu, 2009). Z uporabo RNAi so uspešno utišali: apoptozne gene in tudi gena za kaspazo 3 in 7 (Sung in sod., 2005; Sung in

sod., 2007), apoptozna gena *Bak* in *Bax* (Lim in sod., 2006) in druge (Wong in sod., 2006), glikozilacijske gene, kot sta gena za fukoziltransferazo (Mori in sod., 2004; Yamane-Ohnuki in sod., 2004) in sialidazo (Ngantung in sod., 2006), pa tudi gen *DHFR* (Hong in Wu, 2007; Wu in sod., 2008).

Alternativni pristop za ciljano spreminjanje izražanja genov vključuje uporabo različnih nukleaz, kot so nukleaze z motivom cinkovih prstov (angl. zinc finger nucleases – ZFN), meganukleaze in nukleaze TALEN (angl. transcriptionactivator-like effector nucleases) (Gaj in sod., 2012; Gustafsson in sod., 2012; Kim in sod., 2012; Silva in sod., 2011).

Številni avtorji opisujejo uspešno uporabo nukleaz ZFN za izbijanje genov pri celični liniji CHO. Prvi uspešen poskus opisujejo Santiago in sod. (2008). Ti so izbili gen za DHFR pri 2–3 % vseh celic (Santiago in sod., 2008). Nukleaze ZFN so uspešno uporabili tudi za izbitje genov za α -1,6-fukoziltransferazo (Malphettes in sod., 2010). Cost in sod. (2010) poročajo o zaporednem izbitju genov za *Bak* in *Bax*, s katerim so ustvarili celice CHO, odporne proti apoptozi (Cost in sod., 2010), Liu in sod. (2010) pa poročajo o izbitju treh genov znotraj ene celične linije, in sicer za glutamin sintetazo, dihidrofolat reduktazo in α -1,6-fukoziltransferazo (Liu in sod., 2010). Z uporabo nukleaz ZFN so uspešno utišali tudi gen za encim PAM (peptidil-glicin α -amidirajoča mono-oksigenaza) (Skulj in sod., 2014).

Sekvenciranje genoma CHO je omogočilo tudi razvoj tehnologije regulacije za izražanje genov z uporabo miRNA. MikroRNA so kratke nekodirajoče molekule RNA, ki urejajo izražanje genov in posledično vplivajo na celično fiziologijo (Datta in sod., 2013). MikroRNA delujejo tako, da znižajo izražanje skupine mRNA s tem, ko se vežejo na konec 3' neprevedljive regije (angl. untranslated region – UTR) mRNA in inhibirajo translacijo (Datta in sod., 2013). MikroRNA lahko vplivajo na celično rast, apoptozo, metabolizem, izločanje in specifično produktivnost rekombinantnih proteinov (Barron in sod., 2011; Gammell in sod., 2007; Hackl in sod., 2011; Hernandez Bort in sod., 2012; Jadhav in sod., 2012; Johnson in sod., 2011; Meleady in sod., 2012; Muller in sod., 2008). Sekvenciranje genoma CHO je omogočilo identifikacijo miRNA, predvsem na podlagi homologij znanih miRNA iz drugih organizmov (Datta in sod., 2013). Identificirane miRNA se nato lahko uporabi za čezmerno izražanje ali utišanje regulacije izražanja določenih genov (Hackl in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR CELIČNIH LINIJ

Analizirani vzorci so izvirali iz petih različnih starševskih celičnih linij CHO: CHO der1, CHO der2, CHO der3, CHO der4 in CHO der6 (der označuje derivat). Oseminosemdeset vzorcev je izhajalo iz producirajočih klonalnih celičnih linij, ki proizvajajo mAb (po 20 iz vsake od CHO der1, der3 in der4, 38 iz CHO der2 ter 8 iz CHO der6) in so izvirali iz različnih mešanih populacij celic po transfekciji. Petnajst vzorcev je izviralo iz starševskih celičnih linij (5 celičnih linij, v treh bioloških ponovitvah).

Pregled vzorcev je prikazan v preglednici 1.

Preglednica 1: Pregled vzorcev po celičnih linijah, uporabljenih v naši študiji

Vzorci iz producirajočih celičnih linij CHO, ki proizvajajo mAb, kot tudi vzorci starševskih celičnih linij, ki izvirajo iz treh bioloških ponovitev na linijo, so bili analizirani enkrat.

Table 1: Overview of samples originating from different cell lines used in our study

Samples from mAb producing and parental (in biological triplicates) CHO cell lines were analysed once.

Celična linija	Število vzorcev	
	producirajoče linije CHO (kloni, ki proizvajajo mAb)	starševske linije CHO
CHO der1	20	3
CHO der2	38	3
CHO der3	20	3
CHO der4	20	3
CHO der6	8	3

3.1.1 Pogoji gojenja

Vse celične linije smo gojili kot suspenzijske kulture v stresalnih plastenkah (angl. shaking flask – SF) v Lekovem kemijsko definiranem gojišču brez živalskih komponent. Celične kulture smo gojili v stresalnih inkubatorjih s CO₂ pri pogojih: 37 °C, 110 rpm in 10 % CO₂.

3.2 KARIOTIPIZACIJA

Za vse starševske celične linije CHO smo določili kariotipe z barvanjem po Giemsi (Giemsa, 1904, cit. po Fleischer, 2004).

3.2.1 Priprava metafaznih kromosomov

Celične kulture smo pripravili v stresalnih plastenkah v koncentraciji, ki je zagotovila zadostno število aktivno delečih se celic. Celicam smo dodali inhibitor delitvenih vreten, raztopino kolcemida (Sigma), ki celice blokira v metafazi. Po 4–6-urni inkubaciji smo celice centrifugirali, nato pa jih izpostavili hipotonični raztopini kalijevega klorida (KCl, Gibco), ki povzroči nabrekanje jeder. Hipotonično raztopino smo odstranili s

centrifugiranjem, celice pa fiksirali v hladni fiksirni raztopini očetne kisline in metanola (1:3, v/v). Fiksirna raztopina ustavi hipotonično nabrekanje in tudi vse metabolne procese v celice ter jih s tem fiksira v stabilnem stanju. Korak centrifugiranja in resuspendiranja v fiksirni raztopni smo nekajkrat ponovili, na koncu pa tako pripravljene vzorce metafaznih kromosomov shranili na $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Barvanje z raztopino Giemse

Fiksirane vzorce metafaznih kromosomov smo nanесли na očiščena mikroskopska stekla in jih dobro osušili. Metafazne kromosome na steklih smo obdelali z raztopino tripsina (Sigma), ki delno razgradi kromosome. Nadaljevali smo s spiranjem v pufru in barvanjem v raztopini Giemse (Sigma). Predeli heterokromatina, ki so bogati z adeninom in timinom ter vsebujejo manjše število aktivnih genov, se obarvajo temno. Nasprotno se predeli genoma z manj kondenziranim kromatinom, ki so bogati z gvaninom in citozinom in so transkripcijsko bolj aktivni, obarvajo svetleje. Barvanje po Giemsi tako ustvari edinstvene vzorce svetlih in temnih prog.

Po končanem barvanju smo preparate sprali pod tekočo vodo in dobro osušili na zraku.

3.2.3 Mikroskopiranje in analiza

Reprezentativne kariograme smo za vsako izmed starševskih celičnih linij sestavili na podlagi analize 40 metafaznih celic. Preparato smo analizirali z mikroskopom Axio Imager Z1 (Carl Zeiss), kariotipe pa s programom Ikaros (Metasystems).

3.3 PRIPRAVA PRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ

3.3.1 Transfekcije in ekspresijski vektor

Producerske celične linije, ki proizvajajo mAb smo ustvarili s transfekcijo ekspresijskega vektorja A ali B v starševske celične linije. Oba ekspresijska vektorja nosita zapisa za lahko (Lv) in težko verigo (Tv) mAb, gen *Neo*, ki je odgovoren za odpornost proti antibiotiku G418 in gen za encim DHFR. Nekatere celične linije vsebujejo tudi endogeni gen *DHFR*, ki ga od vnesenega z ekspresijskim vektorjem lahko razlikujemo po nukleotidnem zaporedju. Za namen razlikovanja smo *DHFR*, vnesen z ekspresijskim vektorjem, poimenovali rekombinantni *DHFR* (*rDHFR*), endogeni ali hrčkov gen pa *hDHFR*.

Nukleotidno zaporedje obeh ekspresijskih vektorjev je popolnoma enako za vse omenjene gene (gen za Lv in Tv, *Neo* in *rDHFR*). Vektorja se razlikujeta le v regulatornih elementih (promotor, ojačevalec in poliadenilacijski signal), ki so pred/za genoma za Lv in Tv.

V starševske celične linije smo ekspresijski vektor A ali B vnesli z nukleofektorjem (Nucleofector, Lonza) po navodilih proizvajalca. Po transfekciji smo znotraj mešanih

populacij celic tiste, ki so sprejele ekspresijski vektor, selekcionirali najprej z G418 in na uspešno selekcioniranih mešanih populacijah celic nadaljevali še selekcijo z MTX.

3.3.2 Analiza mešanih populacij celic

Za vsako izmed kombinacij celične linije in ekspresijskega vektorja smo ustvarili po 5 transfekcijskih mešanih populacij celic. Število mešanih populacij celic po posamezni selekcijski stopnji (G418, G418 in MTX) je prikazano v preglednici 2. V namen poenostavitve označevanja smo mešane populacije celic, selekcionirane z G418, označili kot G418 mpc (geneticinske mešane populacije celic), mešane populacije celic, selekcionirane z G418 in MTX, pa kot MTX mpc (metotreksatne mešane populacije celic).

Preglednica 2: Pregled vseh ustvarjenih mešanih populacij celic v tej študiji

Mešane populacije celic, selekcionirane z G418, so označene kot G418 mpc, mešane populacije celic, selekcionirane z G418 in MTX, pa kot MTX mpc.

Table 2: Overview of the pools prepared in the framework of this study

Pools selected using only G418 are named as G418 mpc and pools selected using G418 and MTX are named as MTX mpc.

Celična linija	Ekspresijski vektor	Število nukleofekcij	Število G418 mpc	Število MTX mpc
CHO der1	A	5	5	5
CHO der2	A	5	5	5
CHO der2	B	5	5	5
CHO der3	A	5	5	5
CHO der4	A	5	5	5
CHO der6	A	5	5	5

Za vse ustvarjene mešane populacije celic smo nacepili šaržne kulture oz. kulture z enako začetno koncentracijo celic. Po 10 dneh inkubacije v ustreznih rastnih pogojih (37 °C, 110 rpm in 10 % CO₂) smo kulturam izmerili koncentracijo mAb oz. produktivnost s sistemom Octet QK (ForteBio) po navodilih proizvajalca.

3.3.3 Kloniranje in analiza klonov

Izbrane mešane populacije celic (glede na produktivnost) smo klonirali s tehnologijo ClonePix FL (Molecular Devices). Dobro rastoče celične kulture (tj. v eksponentni fazi rasti, s celično viabilnostjo > 90 %) smo v zelo nizki celični gostoti, ki zagotavlja monoklonalnost, nacepili v mikrotitrne ploščice s 6 vdolbinicami v poltrdno gojišče, sestavljeno iz metilceluloze in koncentriranega osnovnega gojišča, v katerem so celice že predhodno rastle. Kolonije, ki so nastale v poltrdnem gojišču iz posameznih celic, smo z robotom ClonePix FL prenesli v mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami, napolnjenimi s svežim tekočim gojiščem. Pri prenosu smo upoštevali predvsem velikost in obliko kolonij ter oddaljenost med kolonijami. Ko so kloni dosegli zadostno rast, smo jih prenesli naprej v mikrotitrne ploščice s 24 in 6 vdolbinicami ter na koncu v stresalne platenke. Ker v poltrdno gojišče ob nacepiti mpc nismo dodali fluorescentno označenih protitelesa, ki so

usmerjena proti produktu in omogočajo zgodnjo ločevanje klonov glede produktivnosti, smo za vse ustvarjene klone nacepili šaržne kulture. To so kulture z enako začetno koncentracijo celic, ki smo jih nacepili v mikrotitrne ploščice s 24 vdolbinicami. Po 10 dneh inkubacije v ustreznih rastnih pogojih (37° C in 10 % CO₂) smo šaržnim kulturam izmerili produktivnost. Na podlagi dobljenih rezultatov smo produktivnost potrdili še z nacepivitvijo šaržnih kultur z enako začetno koncentracijo celic v stresalnih platenkah. Po 10 dneh inkubacije v ustreznih rastnih pogojih (37 °C in 10 % CO₂) smo kulturam prav tako izmerili produktivnost. Produktivnost smo v obeh rastnih sistemih analizirali z napravo Octet QK (ForteBio) po navodilih proizvajalca.

Za poenostavitev označevanja smo klone, ki izvirajo iz mešanih populacij celic, selekcioniranih z G418, označili kot G418 klone (genetični kloni), klone, ki izvirajo iz mešanih populacij celic, selekcioniranih z G418 in MTX, pa kot MTX klone (metotreksatni kloni).

3.4 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN

DNA in celokupno RNA (totRNA) smo iz celičnih kultur klonov in starševskih celic izolirali v zgodnji eksponentni fazi rasti (72 h po začetku šaržne kulture v stresalnih platenkah). Postopek izolacije smo izvedli na napravi QIAcube (Qiagen) po navodilih proizvajalca. DNA smo izolirali s kompletom QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), totRNA pa s kompletom RNeasy Plus Kit (Qiagen) in predhodno homogenizacijo celic na kolonah QIAshredder.

Izolirano DNA smo raztopili v 100 µl vode, izolirano totRNA pa v 50 µl vode. Koncentracijo izolirane DNA in totRNA smo izmerili spektrofotometrično z aparaturo Nanodrop 1100 (Nanodrop Technologies). Preverili smo tudi razmerje absorbanč $A_{260/280}$, ki ponazarja čistost vzorca. Ustrezna vrednost za DNA je ~1,8, za RNA pa ~2,0. Vzorce DNA smo redčili do koncentracije 100 ng/µl. Vzorce DNA in totRNA smo do analize shranili na -80 °C.

Dodatno smo integriteto totRNA preverili s kompletom RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) in aparaturo Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) po navodilih proizvajalca. Aparatura na osnovi kapilarne elektroforeze izriše elektroferogram kot graf fluorescence v odvisnosti od časa. Pri intaktni totRNA iz elektroferograma razberemo oster vrh za označevalec (~23 s), podenoto 18 S (~40 s) in molekule 28 S rRNA (~48 s), preostali signal pa predstavlja fluorescenco, nižjo od 1. V primeru prisotnosti razgradnih produktov se ti večinoma pojavijo med vrhovi rRNA ali v času, krajšem od 39 s. Izpiše se tudi t. i. RIN (angl. RNA integrity number), številski izraz, ki predstavlja razmerje med vrhovi intaktnih molekul rRNA in preostalimi RNA ter ponazarja integriteto RNA. Pri tem vrednost 1 ustreza popolnoma razgrajeni, vrednost 10 pa popolnoma intaktni RNA.

3.5 OBRATNO PREPISOVANJE

Postopek obratnega prepisovanja totRNA v cDNA smo izvedli za analizo izražanja genov z mikromrežami in tudi s PCR v realnem času. Pri obeh metodah smo uporabili isto izhodno totRNA.

Reakcijo obratnega prepisovanja za namen mikromrež smo izvedli s kompletom MessageAmp Premier RNA Amplification (Ambion) po navodilih proizvajalca. V prvem koraku smo z uporabo začetnega oligonukleotida T7 in reverzne transkriptaze izvedli obraten prepis mRNA in tako pridobili prvo verigo cDNA. Sledili sta istovrstna razgradnja RNA in tvorba komplementarne ali druge verige cDNA. Postopek sinteze cDNA je potekal na robotu Hamilton Microlab Star (Hamilton Robotics). Sestava reakcij je prikazana v preglednici 3, temperaturni potek reakcij pa v preglednici 4.

Preglednica 3: Sestava reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification

Table 3: Composition of the reverse transcription reaction (MessageAmp Premier RNA Amplification)

Sinteza prve verige cDNA	
Komponenta	Količina
Puferska mešanica	4 µL
Encimska mešanica	1 µL
totRNA	200 ng
Voda	dopolnimo do 10 µL

Sinteza druge verige cDNA	
Komponenta	Količina
Voda	13 µL
Puferska mešanica	5 µL
Encimska mešanica	2 µL
cDNA	10 µl
Skupni volumen	30 µL

Preglednica 4: Temperaturni potek reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification

Table 4: Reverse transcription (MessageAmp Premier RNA Amplification) incubation temperatures and times

Aktivnost	Korak 1	Korak 2	Korak 3
Sinteza prve verige cDNA	2 h 42 °C	4 °C	
Sinteza druge verige cDNA	1 h 16 °C	10 min 65 °C	4 °C

Za namen analize izražanja genov s qPCR smo iz vzorcev totRNA po navodilih proizvajalca in s kompletom DNA-freeTM DNA Removal (Life Technologies) najprej odstranili potencialno prisotno genomsko DNA. Pri postopku obratnega prepisovanja v

enoverižno cDNA smo uporabili komplet SuperScript VILO cDNA Synthesis (Life Technologies). Sestava reakcij je prikazana v preglednici 5, temperaturni potek pa je razviden iz preglednice 6.

Preglednica 5: Sestava reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov SuperScript VILO cDNA Synthesis
Table 5: Composition of the reverse transcription reaction (SuperScript VILO cDNA Synthesis kit)

Komponenta	Količina
5 x osnovna zmes VILO	4 µL
10 x encimska mešanica SuperScript	2 µL
totRNA	5 µg
Voda DEPC	dopolnimo do 20 µL

Preglednica 6: Temperaturni potek reakcije obratnega prepisa za komplet reagentov SuperScript VILO cDNA Synthesis
Table 6: Reverse transcription (SuperScript VILO cDNA Synthesis kit) incubation temperatures and times

Pogoji	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura [°C]	25	42	85	-20 °C
Čas [min]	10	90	5	∞

3.6 MIKROMREŽE

V raziskavi smo uporabili mikromreže cDNA proizvajalca Affymetrix, na katerih je zapis za 61223 setov sond. Nukleotidna zaporedja na mikromreži predstavljajo 26227 edinstvenih genov kitajskega hrčka in 14657 edinstvenih mišjih genov iz baze podatkov Ensembl. Mikromreže so bile izdelane po naročilu – to je z izbranimi tarčnimi geni in kontrolami, v velikosti formata 49 (1,28 cm²), kjer so enote posameznih sond premera 11 µm. Nukleotidna zaporedja sond so, kot pri večini mikromrež proizvajalca Affymetrix, za večjo specifičnost hibridizacije zasnovana na principu popolnega (PM) in nepopolnega (MM) ujemanja nukleotidnega zaporedja sond.

Na mikromreži so prisotna tudi določena zaporedja nukleotidov, ki služijo kontroli postopka od sinteze cDNA do fragmentacije in označevanja z biotinom (kontrole poly-A) ter kontroli hibridizacije (hibridizacijske kontrole). Kontrole poly-A so zastopane z zaporedji genov bakterije *B. subtilis*: *dap*, *lys*, *phe*, *thr* in *trp*. Kontroli hibridizacije so namenjena zaporedja genov iz biotinske sinteze bakterije *E. coli* (*bioB*, *bioC* in *bioD*) ter gen za rekombinazo bakteriofaga P1 (*cre*).

3.6.1 Prepisovanje *in vitro*

Sintetizirano cDNA (glej 0) smo s postopkom prepisovanja *in vitro* (angl. *in vitro* transcription – IVT) prevedli v amplificirano RNA (aRNA) s kompletom MessageAmp Premier RNA Amplification (Ambion). V postopku se v nastajajočo aRNA vgradijo

modificirani, z biotinom označeni nukleotidi uracila (biotin-UTP). Sestava reakcij je prikazana v preglednici 7, temperaturni potek pa v preglednici 8.

Preglednica 7: Sestava reakcije prepisovanja *in vitro* za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification

Table 7: Composition of the *in vitro* transcription reaction (MessageAmp Premier RNA Amplification)

Komponenta	Količina
Voda	4 µL
Biotinska IVT-mešanica T7	20 µL
Encimska mešanica T7	6 µg
Dvoverižna cDNA	30 uL
Skupni volumen	60 µL

Preglednica 8: Temperaturni potek reakcije prepisovanja *in vitro* za komplet reagentov MessageAmp Premier RNA Amplification

Table 8: *In vitro* transcription (MessageAmp Premier RNA Amplification) incubation temperatures and times

Aktivnost	Korak 1	Korak 2
Reakcija IVT	5 h 40 °C	4 °C

Za večjo stabilnost smo vzorce aRNA očistili odvečnih nukleozid trifosfatov (NTP), soli, encimov in anorganskih fosfatov ter raztopili v 50 µl elucijske raztopine. Koncentracijo aRNA smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop 1100 (Nanodrop Technologies), velikost molekul aRNA pa z uporabo kompleta RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) ter aparaturo Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Pričakovana velikost aRNA naj bi bila v razponu 250–5500 nukleotidov.

V zadnjem koraku smo aRNA fragmentirali na fragmente velikosti 35–200 nukleotidov. Sestava reakcije je prikazana v preglednici 9. Inkubacija je potekala 35 minut pri 94 °C.

Preglednica 9: Sestava reakcije fragmentacije aRNA s kompletom MessageAmp Premier RNA Amplification

Table 9: Composition of the aRNA fragmentation reaction (MessageAmp Premier RNA Amplification)

Komponenta	Količina
aRNA	15 µg
5 x fragmentacijski pufer	6 µL
Voda	dopolnimo do 30 µL

Postopek priprave z biotinom označene in fragmentirane aRNA je potekal na robotu Hamilton Microlab Star (Hamilton Robotics).

Kontrolo celotnega postopka od sinteze cDNA do fragmentacije in označevanja aRNA smo izvedli po navodilih proizvajalca z uporabo kompleta GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control (Affymetrix). Prokariontsko poly-A-RNA, genov bakterije *B. subtilis* (*lys*,

phe, *thr* in *dap*), smo v določenih koncentracijah (1:100000, 1:50000, 1:25000 in 1:7500 za *lys*, *phe*, *thr* in *dap*) dodali vzorcem totRNA.

3.6.2 Hibridizacija

Vzorci fragmentirane in z biotinom označene aRNA smo na postopek hibridizacije na mikromreže pripravili po navodilih proizvajalca in z uporabo hibridizacijskega modula iz kompleta GeneChip Hybridisation, Wash and Stain (Affymetrix). Kontrolo hibridizacije smo izvedli z uporabo kompleta GeneChip Eukaryotic Hybridization Control (Affymetrix), po navodilih proizvajalca. Komplet vsebuje mešanico z biotinom označenih prokariotskih genov (*bioB*, *bioC* in *bioD* iz *E.coli* ter *cre* iz bakteriofaga P1), ki smo jih v določenih koncentracijah (1,5 pM, 5 pM, 25 pM in 100 pM za *bioB*, *bioC*, *bioD* in *cre*) dodali v hibridizacijsko mešanico posameznega vzorca. Z njimi smo ocenili učinkovitost hibridizacije, neodvisno od kakovosti RNA. Del kompleta GeneChip Eukaryotic Hybridization Control so tudi oligo kontrole B12, ki smo jih prav tako dodali v hibridizacijsko mešanico. Predstavljajo pozitivno kontrolo hibridizacije, s katerimi se nastavi pravilna poravnava mikromreže pri analizi slike.

Sestava hibridizacijske reakcije je prikazana v preglednici 10. Hibridizacijske reakcije smo inkubirali 5 minut pri 99 °C, nato pa še 5 minut pri 45 °C. Na mikromreže, ki smo jih predhodno obdelali oz. napolnili s predhibridizacijsko raztopino ter inkubirali 10 minut pri 45 °C, smo nanесли po 200 ul hibridizacijskih reakcij.

Preglednica 10: Sestava hibridizacijske reakcije s kompletom GeneChip Hybridisation, Wash and Stain
Table 10: Composition of the hybridisation reaction (GeneChip Hybridisation, Wash and Stain)

Komponenta	Količina
Fragmentiran in označen vzorec aRNA	15 µg
Oligo kontrole B12 (3 nM)	5 µL
20 x hibridizacijske kontrole (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	15 µL
2 x hibridizacijska mešanica	150 µL
DMSO	30 µL
Voda	dopolnimo do 300 µL

Hibridizacija je potekala 16 ur pri 45 °C po navodilih proizvajalca v hibridizacijski pečici GeneChip Hybridisation Oven 640 (Affymetrix).

Po končani hibridizaciji smo spiranje in nadaljnje barvanje mikromrež izvedli z uporabo preostalih modulov kompleta GeneChip Hybridisation, Wash and Stain (Affymetrix). Celoten postopek je potekal avtomatizirano na sistemu GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix). Mikromreže smo skenirali z optičnim bralnikom GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Spiranje, barvanje in skeniranje mikromrež smo upravljali z računalnikom s

programom AGCC (Affymetrix GeneChip Command Console, Affymetrix). Program ustvari datoteke s končnicami: .ARR, .DAT, .CEL, .CHP, .JPG, .AUDIT, .Project in .RPT.

3.6.3 Preverjanje kakovosti podatkov iz mikromrež in normalizacija

Osnovno kakovost podatkov iz posamezne mikromreže smo preverili s programom AGCC. V datoteki s končnico .DAT smo preverili ustreznost intenzitete mikromreže in morebitno prisotnost mehurčkov ali prask.

Kakovost mikromrež smo nadalje preverili s programom Expression Console (Affymetrix). Preverili smo poravnavo mreže (s sintetičnim oligonukleotidom B2), vrednosti ozadja (Affymetrix priporoča vrednosti med 20 in 100), kontrole poly-A, hibridizacijske kontrole ter odstotek prisotnih sond glede na celotno število sond na mikromreži.

Surove slikovne datoteke s končnico .CEL smo normalizirali z uporabo algoritma RMA (Robust Multi-array Analysis) (Bolstad in sod., 2003; Irizarry in sod., 2003) v programu GeneSpring GX (Agilent Technologies). Izvedli smo tudi multivariatno analizo na podlagi analize glavnih komponent vseh vzorcev (angl. principal component analysis - PCA), potrdili učinkovitost hibridizacije in preverili kakovost RNA z internimi kontrolami. Interne kontrole so seti sond za določene referenčne geni, ki so prisotni na mikromrežah ločeno kot seti sond 3' in 5'. Ocenili se razmerje 3'/5', ki je pri nerazgrajenih vzorcih RNA manjše od 3.

3.6.4 Statistični modeli

Na normaliziranih podatkih je bila nadaljnja statistična analiza opravljena v programskem okolju R (R Development Core Team, 2005) z uporabo paketa limma (Smyth, 2005). Lažno pozitivne rezultate smo omejili s filtriranjem neizraženih genov tako, da smo izločili vse sete sond, ki so imeli pri več kot 95 % vzorcih signal intenzitete manjši od 5. Nadaljevali smo z 31493 seti sond. Diferencialno izražene gene (Smyth in sod., 2005) med različnimi skupinami vzorcev smo zaznali z modeliranjem po Bayesu z različnimi faktorji, ki smo jih upoštevali pri analizi variance, kot je opisano v posameznem poglavju spodaj (Benjamini in sod., 2001). Mejno vrednost statistične značilnosti (vrednost p) smo postavili pri 0,05.

3.6.4.1 Analiza transkriptoma starševskih celičnih linij

Transkriptom starševskih celičnih linij smo analizirali na dva načina, tako da smo:

- primerjali med seboj različne pare starševskih celičnih linij:
 - CHO der1 - CHO der2
 - CHO der1 - CHO der3
 - CHO der1 - CHO der4
 - CHO der1 - CHO der6
 - CHO der2 - CHO der3
 - CHO der2 - CHO der4
 - CHO der2 - CHO der6
 - CHO der3 - CHO der4
 - CHO der3 - CHO der6
 - CHO der4 - CHO der6
- primerjali vsako izmed starševskih celičnih linij z vsemi preostalimi:
 - CHO der1 – preostale celične linije (der2, der3, der4 in der6)
 - CHO der2 – preostale celične linije (der1, der3, der4 in der6)
 - CHO der3 – preostale celične linije (der1, der2, der4 in der6)
 - CHO der4 – preostale celične linije (der1, der2, der3 in der6)
 - CHO der6 – preostale celične linije (der1, der2, der3 in der4)

Dodatno smo v namen iskanja edinstvenih genov, značilnih za posamezno celično linijo (starševsko in tudi končno rekombinantno celično linijo oz. klon), razširili analizo tako, da smo združeno primerjali klone, ki izvirajo iz določene starševske celične linije in pripadajoče starševske celične linije z vsemi preostalimi kloni in starševskimi celičnimi linijami (npr. kloni CHO der3 in starševska celična linija CHO der3 proti vsem preostalim klonom in starševskim celičnim linijam).

3.6.4.2 Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah

Transkriptom producirajočih celičnih linij (klonov) na različnih selekcijskih stopnjah smo analizirali na dva načina, tako da smo:

- primerjali G418 klone z MTX kloni za vse celične linije hkrati,
- primerjali G418 klone z MTX kloni znotraj posamezne celične linije.

3.6.4.3 Analiza transkriptoma producirajočih celičnih linij

Transkriptom producirajočih celičnih linij (klonov) smo analizirali na dva načina, tako da smo:

- primerjali visoko producirajoče klone (V) z nizko producirajočimi kloni (N) za vse celične linije hkrati,
- primerjali visoko producirajoče klone (V) z nizko producirajočimi kloni (N) znotraj posamezne celične linije.

3.6.5 Obogatitvena analiza na ravni procesov (GSEA)

Poleg statistične analize, opravljene v programskem okolju R, smo vzporedno izvedli tudi analizo podatkov o izraženosti genov z odkrivanjem značilno zastopanih skupin genov v programu GSEA (angl. gene set enrichment analysis – GSEA) (GSEA, 2014). Metoda najprej z izbrano univariatno statistiko (npr. t-test) uredi gene glede na korelacijo med dvema skupinama vzorcev, ki jih primerjamo, nato pa uporabi statistiko Kolmogorov-Smirnov za oceno obogatenosti vsake posamezne skupine genov z diferencialno izraženimi geni (Subramanian in sod., 2005).

Primerjali smo posamezno starševsko celično linijo s preostalimi celičnimi linijami. Kot vhodno tabelo smo uporabili normalizirano tabelo (Genespring) in filtrirano glede na sete sond, ki so imeli dober signal pri več kot 95 % vzorcih (31493 setov sond).

Med nastavitvami smo izbrali permutacijski tip 'gene set' ter metriko za razvrščanje genov 'signal to noise'.

3.7 PCR V REALNEM ČASU (QPCR)

Vse reakcije qPCR smo izvajali na instrumentu ABI Prism[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Redčine DNA oz. cDNA, ustrezne mešanice osnovne zmesi (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystem), začetne oligonukleotide in sonde (Applied Biosystem) smo na mikrotitrski ploščici s 384 vdolbinicami nanesti z uporabo avtomatiziranega sistema QIAgility (Qiagen). Za zaznavanje nastalega produkta smo uporabljali sistem hidrolizirajoče sonde. Uporabljali smo s fluorescentnim barvilom (6-karboksi-fluorescein – FAM) označene hidrolizirajoče sonde. Osnovna zmes TaqMan[®] Universal Master Mix že vsebuje DNA-polimerazo AmpliTaq gold[®] DNA, dNTP, pasivno referenco ROX (6-karboksi-X-rodamin), encim UNG (uracil-DNA-N-glikozilazo), ki preprečuje kontaminacijo s PCR-produkti, in optimizirane komponente pufru. Na vseh mikrotitrskih ploščicah smo uporabljali negativno kontrolno reakcijo (NTC – kontrola brez matrice), pri čemer smo namesto vzorca v reakcijsko mešanico dodali 3 µl vode. NTC predstavlja kontrolo za kontaminacijo z DNA med delom.

3.7.1 Določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa

Število kopij genov za lahko in težko verigo mAb, ki smo jih v genom celic vnesli s transfekcijo, smo določali na vseh izbranih klonih (producerajoče celične linije).

Vse vzorce klonov smo analizirali v štirih redčinah (10 x, 50 x, 100 x, 500 x) in dveh ponovitvah. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 11. Pogoji namnoževanja so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa s qPCR

FP = smiselni začetni oligonukleotid, RP = protismiselni začetni oligonukleotid.

Table 11: Composition of the qPCR reaction mix for the determination of light- and heavy chain transgenes copy numbers

FP = forward primer, RP = reverse primer.

Komponenta	Volumen [μ l]
Osnovna zmes (2x)	5,0
FP (10 μ M)	0,9
RP (10 μ M)	0,9
Sonda (10 μ M)	0,2
Vzorec (DNA)	3,0
Skupni volumen	10,0

Preglednica 12: Pogoji namnoževanja pri qPCR

Table 12: qPCR cycling conditions

Začetni koraki		Pomnoževanje (45 ciklov)	
aktivacija nukleaze UNG	aktivacija AmpliTaq Gold DNA-polimeraze	denaturacija	prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje
2 min 50 °C	10 min 95 °C	15 sek 95 °C	1 min 60 °C

Na vsako qPCR ploščico smo nanesti standardno krivuljo, pripravljeno iz redčin ekspresijskega vektorja in gDNA starševske celične linije CHO der1 (10 x, 50 x, 100 x, 500 x in 100 x) v treh ponovitvah. Vse vzorce smo testirali tudi na količino endogenega gena *Gluc*. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in sonde za gen *Gluc* je prikazano v preglednici 14.

3.7.2 Določevanje prisotnosti določenih genov v genomu

Z metodo qPCR smo potrdili tudi odsotnost ali prisotnost določenih genov v genomu starševskih celičnih linij. Vse vzorce starševskih celičnih linij smo analizirali v dveh redčinah (10 x in 100 x) in treh ponovitvah. Uporabili smo teste TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems). Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 13, pogoji

namnoževanja pa v preglednici 12. Seznam in zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond za testirane gene so prikazani v preglednici 14.

Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za določevanje prisotnosti določenih genov v genomu s qPCR

Table 13: qPCR reaction composition

Komponenta	Volumen [μ l]
2 x osnovna zmes	5
10 x test (zač. oligonukleotidi + sonda)	1
Voda	1
Vzorec (DNA)	3
Skupni volumen	10

Preglednica 14: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za qPCR

FP = smiselni začetni oligonukleotid, RP = protismiselni začetni oligonukleotid, S = sonda.

Table 14: Primer and probe sequences used for the qPCR

FP = forward primer, RP = reverse primer, S = probe.

Gen	FP	RP	S
<i>Ejemp1</i>	GAGACCACTAATGAGTGCCGA	ACGGAAGCCGCCATGATAATT	CCAGCACATTTTCATCTTC
<i>AL593850</i>	GGCATGGACACAGCACAGT	ACCAATTGTTTCATCACTGGAATGCT	CTGAGAGCTTTGATTTTC
<i>AC140370</i>	GAGGGACTGGTTTATCTTTCTTTC	TTCATTGATAACTTAGTTATTCCTGGAT	ATGCTCAGAGAAATCA
<i>Nrxn1</i>	TTTTATGACCTACACAAAATCTAGCAGGT	CTTCCAAAACCTATAATCCTATCCTTTCCT	CCCCTCCAATGCAG
<i>Srpx</i>	CTCCTTCAGCATGGTGCTAGTG	ACTAGGGACACATAGCGTTCCTTG	CCATGCCCTGCTTATC
<i>Abca5</i>	CACTTTTCATTGTGTTAAATGCCATCA	ACTTTCATTTGTGTAATATGCTATTTCAGGAAAA	AAGCAGGCATTAATTTT
<i>Acadm</i>	CAGGCTCTGACGTGGCT	CCACATCTTCTGGCCATTGATAACA	CTGCTCTGGTCTTAATGC
<i>Nedd4l</i>	GCCTTGATTACCTCCATACGAAAC	CTCCACGGCCATGAGAAGT	TCTCCCGCAAATCT
<i>Dhx40</i>	GCCAAGCTCTCTGCGTTCT	TCTGACTGGATAGAGCCTTCCA	TTGGAAATGCCCCATATT
<i>Msh3</i>	ACACATGATGTAAAGGACCTGCAC	GGGAGAGAAGTCTATATTCCTCTGT	CCTGCATAGAGGATCTG
<i>hDHFR</i>	TCTGGACGATGCCTTAAACTTATTGA	GGAACTGCCTCCAACATATCCAAA	CCATGTCCACTTTATCTGC
<i>Gluc</i>	ATTTGCCAAACGCCACCACGAT	CCAAGCAATGAATTCCTTTGC	CTGAAGGGACCTTACCA

3.7.3 Analiza izražanja genov

3.7.3.1 Testiranje na prisotnost genomske DNA

V vzorcih cDNA smo morebitno prisotnost genomske DNA (gDNA) preverili z uporabo za hrčkov gen specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde. Začetni nukleotidi in sonda so bili načrtovani, tako da zaznajo le DNA. Testirali smo 4 poljubne vzorce totRNA (pred obdelavo z DNAzo) ter 4 iste vzorce po obdelavi z DNAzo. Vseh 8 vzorcev smo testirali v treh redčinah (10 ng, 1 ng in 0,1 ng) in treh ponovitvah. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 13, pogoji namnoževanja pa v preglednici 12.

3.7.3.2 Izvedba reakcije qPCR za analizo izražanja genov

Reakcije smo izvedli z uporabo testov TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems). Njihovo delovanje smo pred glavno izvedbo reakcij preverili z izvedbo qPCR na 10 poljubnih vzorcih cDNA (po 2 iz vsake celične linije) ter testirali v treh redčinah (10 x, 100 x in 1000 x) in dveh ponovitvah. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 13, pogoji namnoževanja pa v preglednici 12.

Vsak vzorec cDNA smo glede na rezultate iz preverjanja delovanja testov TaqMan Gene Expression analizirali v dveh redčinah (10 x in 100 x ali 1 x in 10 x) in dveh ponovitvah. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 13, pogoji namnoževanja pa v preglednici 12.

Vsak vzorec smo poleg izbranih genov testirali tudi na prisotnost štirih referenčnih genov (*GAPDH*, *ACTB*, *EF-1* in *G6PD*). Referenčne gene smo izbrali na podlagi izkušenj v predhodno izvedenih študijah (Doležal, 2009).

Za vsak testiran gen, razen referenčnih, smo na mikrotitrsko ploščo nanesti tudi standardno krivuljo, ki smo jo pripravili iz redčin (1 x, 5 x, 10 x, 50 x, 100 x, 500 x, 1000 x in 5000 x) mešanice cDNA. Mešanico cDNA smo pripravili, tako da smo iz vsake izmed reakcij cDNA (glej 0) odvzeli nekaj μ l in tako pripravili založno raztopino mešanice cDNA.

Vsi uporabljeni začetni oligonukleotidi in sonde so zbrani v preglednici 15.

Preglednica 15: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za analizo izražanja genov s qPCR

FP = smiselni začetni oligonukleotid, RP = protismiselni začetni oligonukleotid, S = sonda.

Table 15: Primer and probe sequences used for the gene expression analysis with qPCR

FP = forward primer, RP = reverse primer, S = probe.

Gen	FP	RP	S
<i>Efemp1</i>	GAGACCACTAATGAGTGCCGA	ACGGAAGCCGCATGATAATT	CCAGCACATTTCATCTTC
<i>AL593850</i>	GGCATGGACACAGCACAGT	ACCAATTGTTCATCACTGGAATGCT	CTGAGAGCTTGTATTTTC
<i>AC140370</i>	GAGGGACTGGTTTATCTTTCTTTC	TTCATTGATAACTTAGTTATTCCTGGAT	ATGCTCAGAGAAATCA
<i>Nrxn1</i>	TTTTATTGACCTACACAAAATCTAGCAGGT	CTTCCAAAACCTATAATCCTATCCTTTCT	CCCCTCCCAATGCAG
<i>Srpx</i>	CTCCTTCAGCATGGTGCTAGTG	ACTAGGGACACATAGCGTTCTTTG	CCATGCCCTGCTTATC
<i>Abca5</i>	CACCTTTTGCAATTTGTAAATGCCATCA	ACTTTCATTTTGTGTAATATGCTATTTCAGGAAAA	AAGCAGGCATTAATTTT
<i>Acadm</i>	CAGGCTCTGACGTGGCT	CCACATCTTCTGGCCATTGATAACA	CTGCTCTGGTCTTAATGC
<i>Nedd4l</i>	GCCTTGATTTACCTCCATACGAAAC	CTCCACGGCCATGAGAAGT	TCTCCCGCAAATCT
<i>Dhx40</i>	GCCAAGCTCTCTGCGTTCT	TCTGACTGGATAGAGCCTTCCA	TTGGAAATTGCCCATATT
<i>Msh3</i>	ACACATGATGTAAAGGACCTGCAC	GGGAGAGAAGTCTATATCCCTCTGT	CCTGCATAGAGGATCTG
<i>AC124993.19</i>	CGCCCATCTCAGCTTCTTCAA	ATGATAAACCTACTCCCTCTTTCCA	CATCTCACAGAAAATC
<i>GAPDH</i>	TCAACGGGAAGGCCATCAC	CCATTGTGATGTGGCGGGATC	CCATGTCCACTTTATCTGC
<i>ACTB</i>	AGCCACGCTCGGTGAC	CATCCTGCGTCTGGACCT	TTGGAAATTGCCCATATT
<i>G6PD</i>	ACAACATTGCCTGTGTGATCCT	CCCAAATTCATCAAAAGTAGCCC	CTGCATAGAGGATCTG
<i>EF1</i>	CCTGGAATGGTGGTTACCTTTG	CATGGTGCATTTCACAGACTTTACT	CTGCTCTGGTCTTAATGC
<i>NCLN_3UTR</i>	AAATGTCCTTCCACCCAAGTC	CTCAGGGCTGCAGGCT	CACTCCAGCCACCTCC
<i>NCLN_E1314</i>	TCGGCTTGGCGTACACA	CAGCCTCTGCACAGTCTTGTA	CCGTCCAGCACTTCCA
<i>NCLN_NEW</i>	AAATGTCCCTTCCACCCAAGTC	CACCTCAGCCACCTCTG	CCTGTACCAGCACCTG
<i>VAMP1</i>	TGCTTACTGGGAAGTAGGTCTT	CACAAAACCTCCAGGGATACAATGT	CCAACTGCCAAACAAG
<i>FKBP10</i>	GCCTGTTTGAAGACATGGATCTCA	GTCTTTGCCCCTATTCACTTG	CCGAGAAGAGTTCTCC
<i>SLC17A6</i>	TGTGTTTCAAAGTACTATCATGTGACCAT	GCAACAAAATGACAGTTACATCCT	CAGCACAGCAAAGGTT
<i>rDHFR</i>	TGGATAGTCGGAGGCAGTTCT	CTGAGGTGGCCTGGTTGATT	CATGGCTTCTGGTAAAC
<i>hDHFR</i>	GCTAGATGAATAAGTACAAAGGGCAGAA	TTTGATCTAATTTCTTTAAAGTCTGAGTTCTAGCT	CTGCTGTTTAAACCC
<i>Neo</i>	CGACCACCAAGCGAAACATC	CGACAAGACCGGCTTCCAT	ATCGAGCGAGCAGTACT
<i>DKK3</i>	TTGCTATGTAATAACTCTTCCACAT	GTGATATGTTCAGATTAAAGTTTCAAAG	CCTTGTAACACTTAAAGC
<i>ACTC1</i>	CAGGCCATCCATTGTCCAT	GCACAATACCACCATCCTGAATGTA	CAAGTGCTTCTAAGATGTC
<i>RARRES2</i>	GCCCAATACTGAAGCAAGGACTT	CCAGCCTGTGTTATCTATTGCA	CTCCTGAGGCTCTCC
<i>RUNX2</i>	CTTTGTGTTTTATTCTTATTTTCTGATTGC	TGACCTGTGGTACAAAGCAGAATT	CATGGAAAGCAAACCTT

3.7.4 Obdelava podatkov

Podatke PCR v realnem času smo analizirali s programom SDS 2.3 (Applied Biosystems). Za vsak amplikon smo izbrali avtomatsko določitev bazne linije (vrednost cikla pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja), prazno vrednost (vrednost fluorescence, pri

kateri amplifikacijski signal preseže signal ozadja; v eksponentnem območju pomnoževanja) pa smo ročno nastavili na 0,1. Na podlagi tega je za vsako reakcijo program izračunal vrednosti C_q (angl. quantification cycle), to je vrednost oz. cikel, v katerem fluorescenca nakopičenega produkta PCR preseže linijo prazne vrednosti. Vrednost C_q je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA, zato jo lahko uporabljamo za izračun absolutne in relativne količine cDNA določenega amplikona.

Z vrednostjo C_q istega vzorca v različnih redčitvah smo izračunali učinkovitost pomnoževanja posameznega amplikona (E). Ta je odvisna od naklona (S) linearne regresijske krivulje v grafu odvisnosti vrednosti C_q od log₁₀ koncentracije tarčnega zaporedja: $E = 10^{(1-S)}$.

Stoodstotna učinkovitost (E = 2) ustreza naklonu S = -3,33 in pomeni, da se v vsakem ciklu qPCR ena kopija pomnoži v dve novi. E smo lahko izračunali za vsak vzorec, saj smo analizirali dve redčitvi vzorca.

Število kopij genov za Lv in Tv mAb smo izračunali po metodi absolutne kvantifikacije. Število kopij genov v vzorcu smo odčitali iz standardne krivulje. Standardna krivulja kaže linearno razmerje med vrednostmi C_q in logaritmskimi vrednostmi števila kopij standardne DNA. Metoda predvideva, da sta učinkovitosti pomnoževanja nukleotidnega zaporedja v vzorcu in standardu enaki (Wong in Medrano, 2005). Število kopij genov za Lv in Tv mAb smo izračunali kot razmerje med genom *Gluc* in genoma za Lv/Tv na celico.

Za izračun števila kopij mRNA testiranega gena smo prav tako uporabili pristop absolutne kvantifikacije (Pfaffl, 2001). Število kopij mRNA smo najprej odčitali iz standardne krivulje, pripravljene iz mešanice cDNA, nato pa vrednost normalizirali na povprečno izražanje izbranih referenčnih genov. Ustreznost referenčnih genov smo preverili tudi z uporabo statističnih programov geNorm (Leonxie, 2014) in NormFinder (MOMA, 2014).

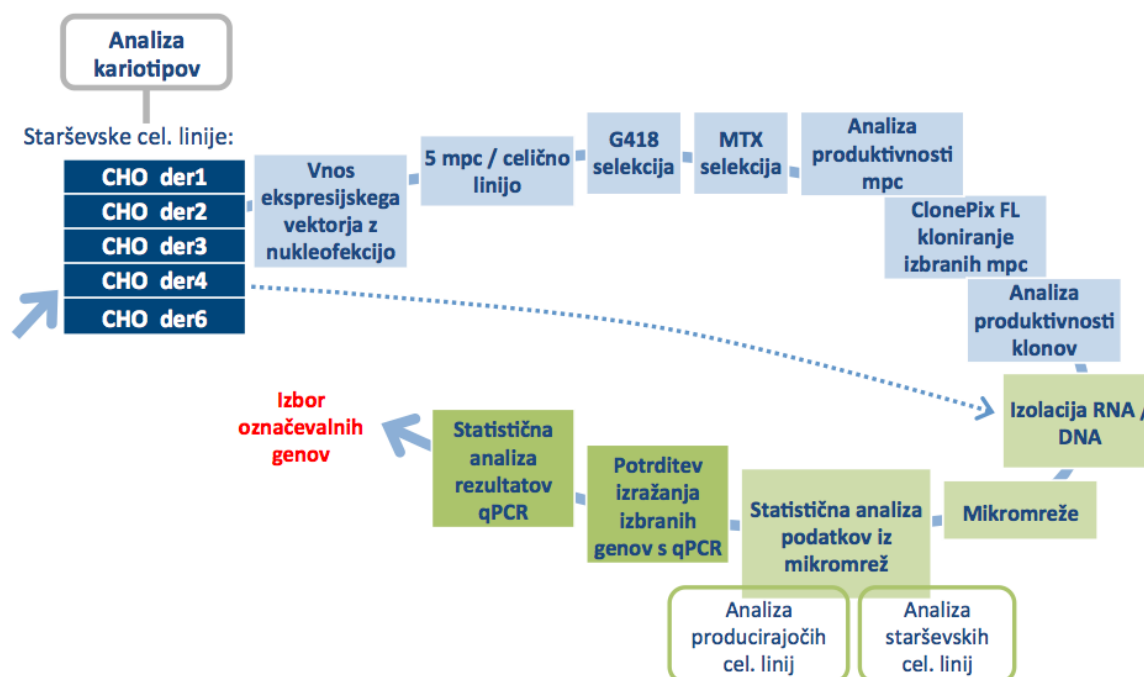
Dobljene vrednosti razmerij smo log₂ transformirali in s t-testom (Welch two sample t-test) izračunali vrednosti p. Kot mejo za statistično značilnost smo določili vrednost p < 0,05.

Vse matematične operacije so bile izvedene v programu Microsoft Excel (Microsoft).

Vse obdelave podatkov, pridobljenih iz analize transkriptoma neproducirajočih celičnih linij, analize izražanja *rDHFR*, *hDHFR* in *Neo*, analize transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah (G418, MTX) ter analize transkriptoma producirajočih celičnih linij, so bile izvedene na enak opisan način.

4 REZULTATI

Shematski potek dela, ki vključuje obdelavo starševskih celičnih linij in tudi nastanek poducirajočih celičnih linij ter nadaljnji koraki vse do statistične analize transkriptoma in izbora ključnih označevalnih genov, je prikazan na sliki 4.

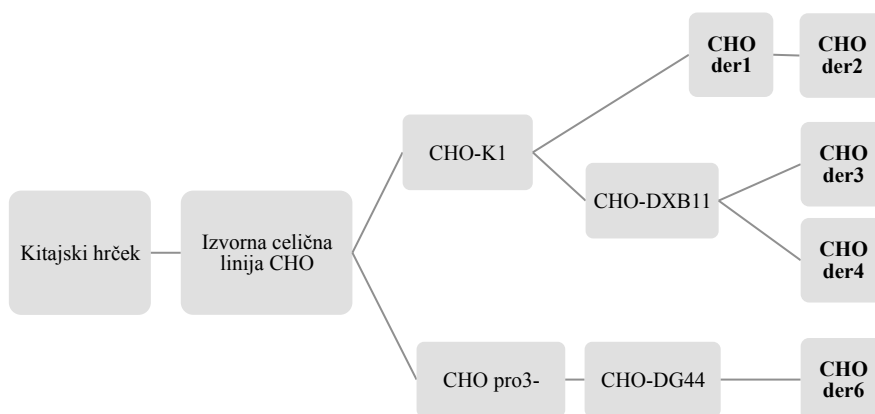


Slika 4: Shema dela

Figure 4: Overview of thesis work

4.1 IZBOR CELIČNIH LINIJ

Izvorna celična linija CHO je bila izolirana iz ovarijev samice kitajskega hrčka (*Cricetulus griseus*) (Puck in sod., 1958). Pregledali smo zgodovino nastanka celičnih linij, analiziranih v tej študiji. Iz izvorne celične linije CHO je nadalje nastala celična linija CHO-K1 (Kao in Puck, 1968; Wurm, 2013), ki predstavlja izvor za štiri starševske celične linije, analizirane v tej študiji: CHO der1, CHO der2, CHO der3 in CHO der4. Iz izvorne celične linije je nastala tudi od prolina odvisna celična linija CHO-pro3-, iz nje pa nadalje z mutagenezo celična linija z izbitima aleloma gena *DHFR*, poimenovana CHO-DG44 (Urlaub in sod., 1983). Zadnja celična linija predstavlja izvor starševske linije CHO der6. Zgodovina oz. izvor analiziranih celičnih linij CHO je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Izvor analiziranih starševskih celičnih linij CHO

Figure 5: Schematic view of cell line origin indicating the history of analysed parental CHO cell lines

Vseh pet analiziranih starševskih celičnih linij CHO je bilo v svoji zgodovini adaptiranih na rast v suspenziji in tudi na različna rastna gojišča. Celični liniji CHO der1 in CHO der2 sta bili v svojem nastanku podvrženi najmanjšemu številu manipulacij, kar je vključevalo predvsem adaptacije na različna rastna gojišča. CHO der2 izvira iz CHO der1 in predstavlja njeno subpopulacijo (slika 5). Celične linije CHO der3, CHO der4 in CHO der6 so bile kot omenjeno adaptirane na različna rastna gojišča, njihove prednice pa v preteklosti podvržene še kemijski mutagenezi in/ali mutagenezi z obsevanjem.

4.2 KARIOTIP IZBRANIH STARŠEVSKIH CELIČNIH LINIJ

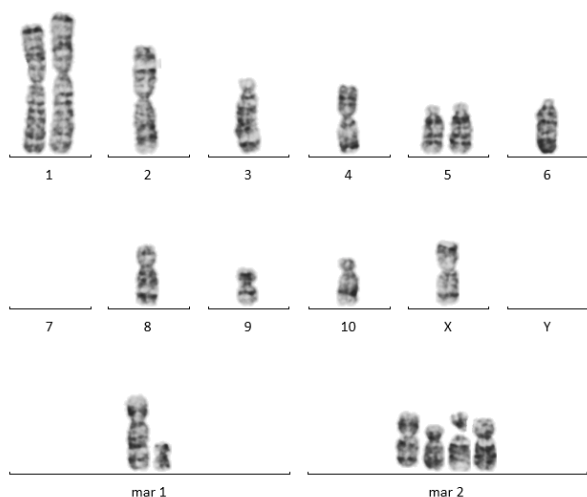
Starševske celične linije CHO lahko ločujemo na podlagi razlik v njihovih kariotipih. V nasprotju z diploidnim genomom normalnih hrčkovih celic, ki vsebujejo 22 kromosomov (10 avtosomnih parov in dva spolna kromosoma), število kromosomov v analiziranih starševskih celičnih linijah CHO odstopa. Celične linije CHO der1, CHO der2 in CHO der6 so psevdodiploidne celice, CHO der3 je mešanica psevdodiploidnih in poliploidnih celic ter CHO der4 so psevdotriploidne celice. Število kromosomov za posamezne starševske celične linije je zbrano v preglednici 16.

Preglednica 16: Število kromosomov v analiziranih starševskih celičnih linijah CHO

Table 16: Number of chromosomes in analysed CHO parental cell lines

Celična linija	Ploidnost	Število kromosomov
CHO der1	psevdodiploidne c.	18–20
CHO der2	psevdodiploidne c.	17–19
CHO der3	psevdodiploidne/poliploidne c.	17–21/32–34
CHO der4	psevdotriploidne c.	29–37
CHO der6	psevdodiploidne c.	19–21

Najpogostejše število kromosomov oz. najbolj reprezentativni kariotipi posameznih starševskih celičnih linij CHO, analiziranih v študiji, so prikazani na slikah od 6 do 10.

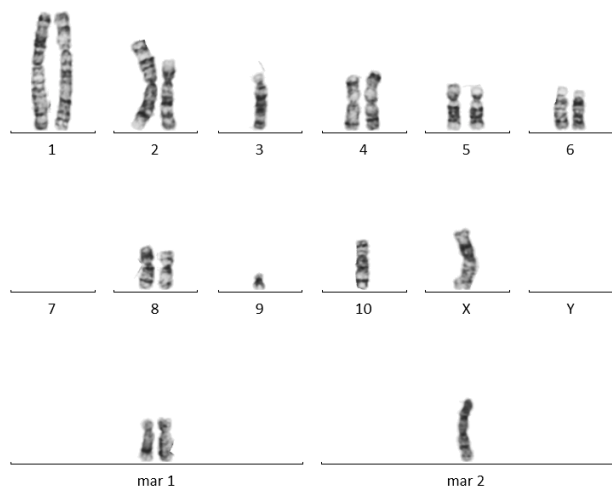


Slika 6: Kariotip celične linije CHO der1

Kromosomi, ki so glede na hrčkove zelo spremenjeni oz. prerazporejeni, da nam jih ni uspelo uvrstiti, so klasificirani kot mar.

Figure 6: Karyotype of CHO der1 cell line

The chromosomes that are highly rearranged and could not be classified as normal based on hamster chromosomes are classified as mar.

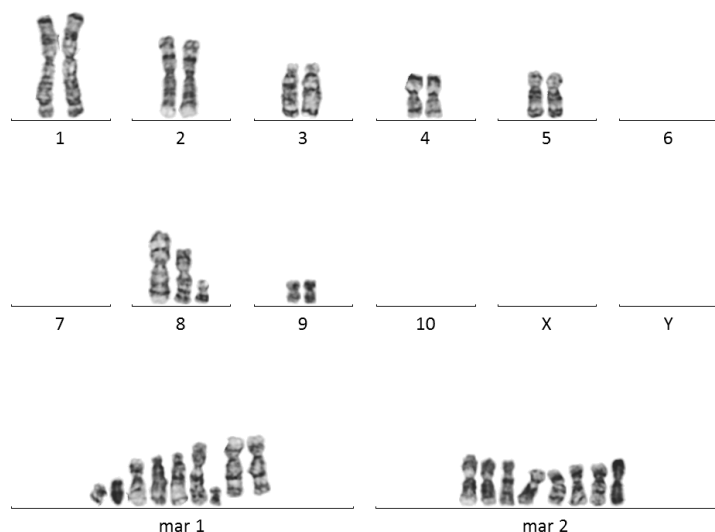


Slika 7: Kariotip celične linije CHO der2

Kromosomi, ki so glede na hrčkove zelo spremenjeni oz. prerazporejeni, da nam jih ni uspelo uvrstiti, so klasificirani kot mar.

Figure 7: Karyotype of CHO der2 cell line

The chromosomes that are highly rearranged and could not be classified as normal based on hamster chromosomes are classified as mar.

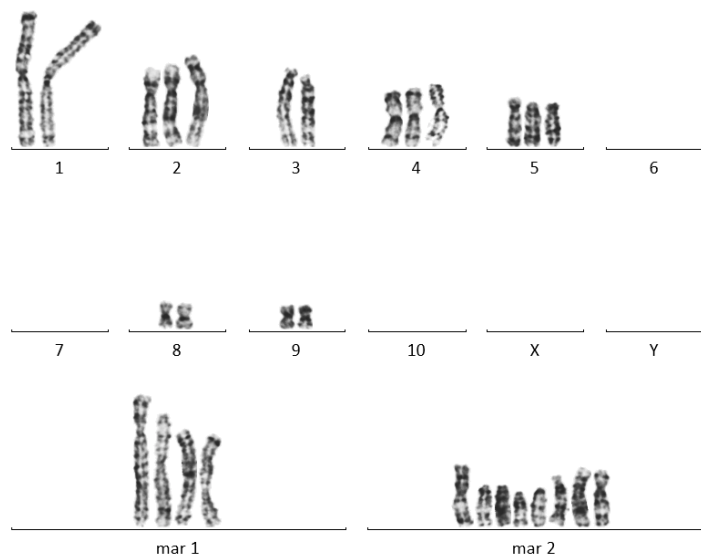


Slika 8: Kariotip celične linije CHO der3

Kromosomi, ki so glede na hrčkove zelo spremenjeni oz. prerazporejeni, da nam jih ni uspelo uvrstiti, so klasificirani kot mar.

Figure 8: Karyotype of CHO der3 cell line

The chromosomes that are highly rearranged and could not be classified as normal based on hamster chromosomes are classified as mar.

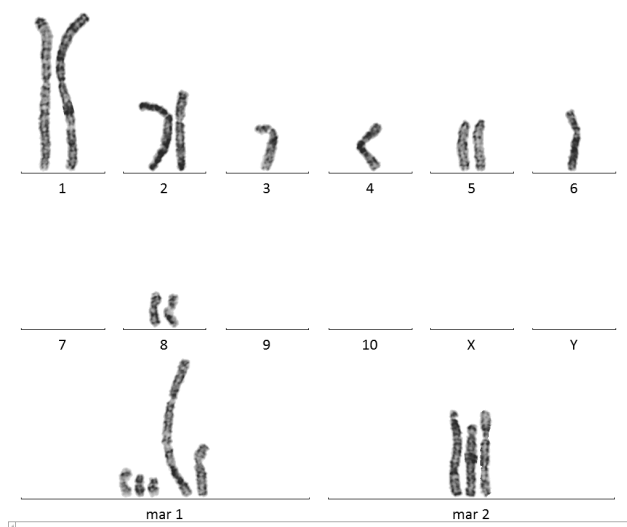


Slika 9: Kariotip celične linije CHO der4

Kromosomi, ki so glede na hrčkove zelo spremenjeni oz. prerazporejeni, da nam jih ni uspelo uvrstiti, so klasificirani kot mar.

Figure 9: Karyotype of CHO der4 cell line

The chromosomes that are highly rearranged and could not be classified as normal based on hamster chromosomes are classified as mar



Slika 10: Kariotip celične linije CHO der6

Kromosomi, ki so glede na hrčkove zelo spremenjeni oz. prerazporejeni, da nam jih ni uspelo uvrstiti, so klasificirani kot mar.

Figure 10: Karyotype of CHO der6 cell line

The chromosomes that are highly rearranged and could not be classified as normal based on hamster chromosomes are classified as mar.

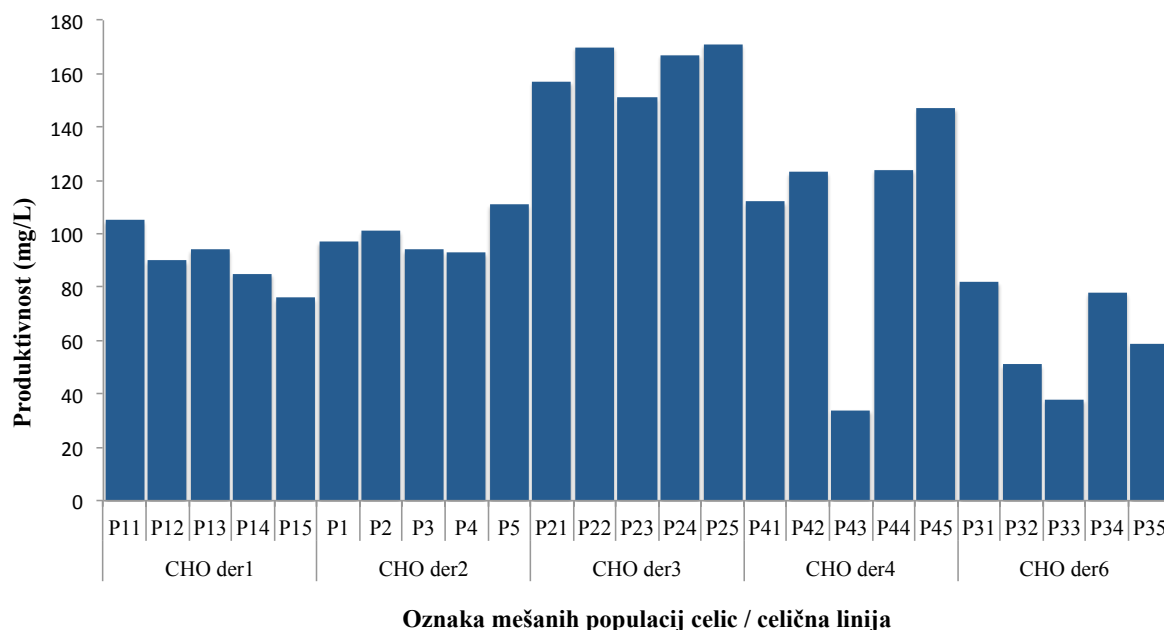
4.3 PRIPRAVA PRODUCIRAJOČIH CELIČNIH LINIJ

4.3.1 Transfekcije in ekspresijski vektor

Za ekspresijski vektor B smo v študiji, ki ni bila del te naloge, ugotovili, da mu manjka približno 200 bp znotraj ekspresijske kasete za gen *rDHFR*. Ker bi to lahko vplivalo na ekspresijski profil klonov, transficiranih z ekspresijskim vektorjem B (18 klonov), smo te izločili iz statističnih analiz. Študijo smo nadaljevali z 88 kloni, ki so nastali s transfekcijo z ekspresijskim vektorjem A in 15 vzorci, ki izvirajo iz starševskih celičnih linij.

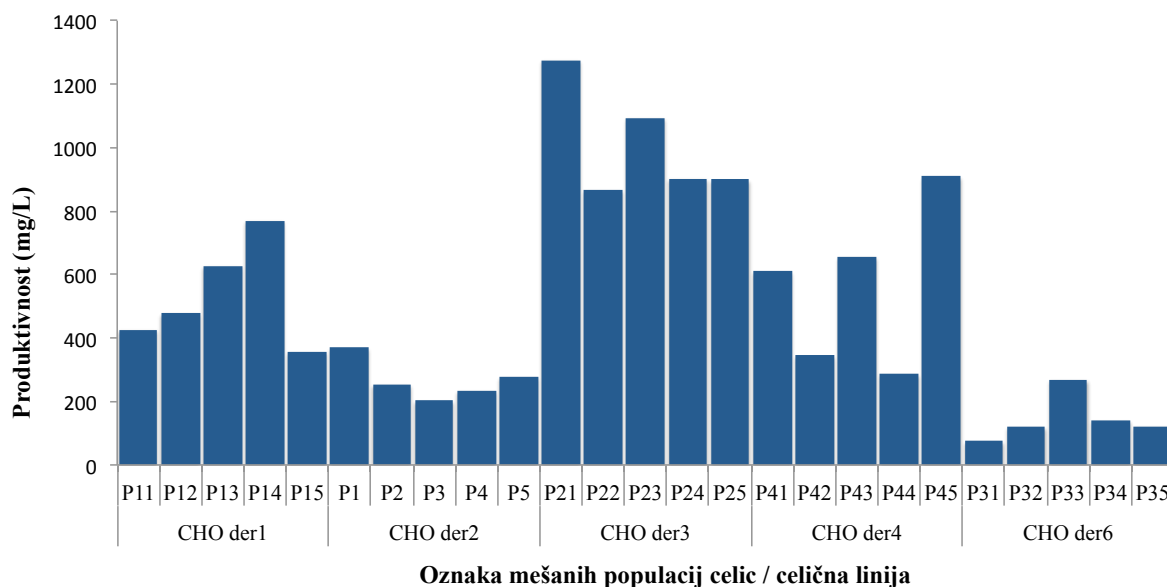
4.3.2 Analiza mešanih populacij celic

Produktivnost vseh ustvarjenih mešanih populacij celic, transficiranih z ekspresijskim vektorjem A po selekciji z G418, so prikazani na sliki 11, po selekciji in amplifikaciji z G418 in MTX pa na sliki 12.



Slika 11: Produktivnost mešanih populacij celic po selekciji z G418
Produktivnost je bila izmerjena v 10-dnevni šaržni kulturi v stresalnih plastenkah in izmerjena na napravi Octet QK.

Figure 11: Productivity of pools selected with G418
Productivity was obtained in 10-day batch cultures in shaking flasks and measured using Octet QK.



Slika 12: Produktivnost mešanih populacij celic po selekciji z G418 in MTX
Produktivnost je bila izmerjena v 10-dnevni šaržni kulturi v stresalnih plastenkah in izmerjena na napravi Octet QK.

Figure 12: Productivity of pools selected with G418 and MTX
Productivity was obtained in 10-day batch cultures in shaking flasks and measured using Octet QK.

Na podlagi produktivnosti smo nadalje klonirali izbrane mešane populacije celic po končani selekciji z G418 oz. G418 in MTX. Izbor mešanih populacij celic s pripadajočimi produktivnostmi je prikazan v preglednici 17.

Preglednica 17: Mešane populacije celic, izbrane za kloniranje

Mešane populacije celic, selekcionirane z G418, so označene kot G418 mpc, mešane populacije celic, selekcionirane z G418 in MTX, pa kot MTX mpc.

Table 17: Pools selected for cloning

Pools selected using only G418 are named as G418 mpc, and pools selected using G418 and MTX are named as MTX mpc.

Celična linija	G418 mpc		MTX mpc	
	Oznaka	Produktivnost (mg/L)	Oznaka	Produktivnost (mg/L)
CHO der1	G418_P11	105	MTX_P11	427
	G418_P13	94	MTX_P13	628
	G418_P14	85	MTX_P14	771
CHO der2	G418_P1	97	MTX_P1	370
	G418_P2	101	MTX_P2	254
	G418_P3	94	MTX_P3	203
CHO der3	G418_P21	157	MTX_P21	1276
	G418_P23	151	MTX_P23	1094
	G418_P24	167	MTX_P24	903
CHO der4	G418_P41	112	MTX_P41	610
	G418_P42	123	MTX_P42	345
	G418_P44	124	MTX_P44	287
	G418_P45	147	MTX_P45	909
CHO der6	G418_P32	51	MTX_P32	121
	G418_P33	38	MTX_P33	269
	G418_P34	78	MTX_P34	141

4.3.3 Kloniranje in analiza klonov

V preglednici 18 je podano število vseh ustvarjenih klonov, ločeno po linijah ter po njihovem izvoru (mešani populaciji celic). Vsem ustvarjenim klonom (748) smo izmerili produktivnost v mikrotitrskih ploščicah s 24 vdolbinicami, za izbrane klone (283) pa produktivnost potrdili tudi v večjem volumnu na ravni stresalnih plasten. Na podlagi teh rezultatov smo za nadaljnje analize transkriptoma (mikromreže, qPCR) izbrali 88 klonov.

Preglednica 18: Pregled števila vseh klonov ter število klonov, izbranih za nadaljnje analize transkriptoma 24w = mikrotitrna ploščica s 24 vdolbinicami, SF = stresalna platenka, mpc = mešana populacija celic. Mešane populacije celic z oznako G418_Pxy so bile selekcionirane le z G418, z oznako MTX_Pxy pa z G418 in MTX.

Table 18: The number of all generated clones and the number of clones selected for further transcriptome analysis

24w = 24-well microtiter plate, SF = shaking flask, mpc = pool. The pools labeled with G418_Pxy were selected using G418 only, and the pools labeled with MTX_Pxy with both G418 and MTX.

Celična linija	Oznaka G418/MTX mpc	Število ustvarjenih klonov (24w)	Število klonov v SF	Število izbranih klonov
CHO der1	G418_P11	32	7	4
	G418_P13	44	7	4
	G418_P14	23	6	2
	MTX_P11	22	8	4
	MTX_P13	68	68	4
	MTX_P14	5	5	2
CHO der2	G418_P1	31	6	2
	G418_P2	31	7	5
	G418_P3	23	6	3
	MTX_P1	11	5	2
	MTX_P2	20	6	3
	MTX_P3	38	8	5
CHO der3	G418_P21	15	6	5
	G418_P23	24	6	3
	G418_P24	20	6	2
	MTX_P21	21	7	3
	MTX_P23	22	6	3
	MTX_P24	24	8	4
CHO der4	G418_P41	24	6	1
	G418_P42	22	6	3
	G418_P44	24	7	3
	G418_P45	22	6	3
	MTX_P41	17	4	2
	MTX_P42	14	9	2
	MTX_P44	24	21	3
	MTX_P45	20	9	3
CHO der6	G418_P32	2	2	/
	G418_P33	20	10	2
	G418_P34	14	6	2
	MTX_P32	23	6	2
	MTX_P33	24	7	2
	MTX_P34	24	6	/
skupaj		748	283	88

Oznake izbranih klonov in njihova produktivnost so prikazani v preglednici 19. Produktivnosti za vse preostale ustvarjene klone na ravni mikrotitrskih ploščic in tudi v stresalnih plastenkah so zbrane v prilogah od A do E.

Preglednica 19: Oznake izbranih klonov s produktivnostjo iz stresalnih plasten
Table 19: Designation of selected clones with shake flask productivity

Celična linija	Oznaka klona	Produktivnost (mg/L)	Oznaka klona	Produktivnost (mg/L)
CHO der1	G418 P11 11	0	MTX P11 9	188
	G418 P11 18	0	MTX P11 11	61
	G418 P11 21	73	MTX P11 12	45
	G418 P11 25	234	MTX P11 20	173
	G418 P13 2	139	MTX P13 40	1308
	G418 P13 4	41	MTX P13 105	249
	G418 P13 11	0	MTX P13 113	302
	G418 P13 15	0	MTX P13 123	1174
	G418 P14 11	0	MTX P14 2	351
	G418 P14 15	54	MTX P14 5	377
CHO der2	G418 P1 14	4	MTX P1 5	0
	G418 P1 21	33	MTX P1 7	0
	G418 P2 3	26	MTX P2 7	960
	G418 P2 14	0	MTX P2 15	0
	G418 P2 19	28	MTX P2 18	2018
	G418 P2 22	34	MTX P3 5	1249
	G418 P2 26	0	MTX P3 7	803
	G418 P3 2	15	MTX P3 9	0
	G418 P3 5	0	MTX P3 16	949
	G418 P3 10	0	MTX P3 29	0
CHO der3	G418 P21 2	433	MTX P21 4	342
	G418 P21 7	30	MTX P21 7	90
	G418 P21 8	311	MTX P21 20	82
	G418 P21 11	40	MTX P23 3	75
	G418 P21 15	44	MTX P23 8	253
	G418 P23 8	276	MTX P23 16	98
	G418 P23 10	72	MTX P24 3	37
	G418 P23 22	330	MTX P24 17	287
	G418 P24 7	32	MTX P24 22	248
	G418 P24 20	263	MTX P24 24	304
CHO der4	G418 P41 10	0	MTX P41 2	57
	G418 P42 3	0	MTX P41 11	363
	G418 P42 7	18	MTX P42 2	347
	G418 P42 21	29	MTX P42 10	0
	G418 P44 20	0	MTX P44 10	376
	G418 P44 22	0	MTX P44 16	20
	G418 P44 24	478	MTX P44 22	304
	G418 P45 8	62	MTX P45 6	357
	G418 P45 18	35	MTX P45 7	37
	G418 P45 20	0	MTX P45 20	0
CHO der6	G418 P33 1	60	MTX P32 4	0
	G418 P33 2	0	MTX P32 20	60
	G418 P34 5	0	MTX P34 11	116
	G418 P34 13	51	MTX P34 13	0

Glede na produktivnost smo izbrane klone razvrstili v tri produktivnostne skupine:

- visoko producirajoči kloni (V) s produktivnostjo nad 301 mg/L,
- srednje producirajoči kloni (S) s produktivnostjo 51–300 mg/L,
- nizko producirajoči kloni (N) s produktivnostjo pod 50 mg/L.

Distribucija izbranih klonov glede na produktivnost je prikazana na sliki 13.

4.4 ANALIZE NA RAVNI DNA

4.4.1 Izolacija DNA

Koncentracije izolirane DNA izbranih klonov in vseh starševskih celic, izmerjenih na spektrofotometru Nanodrop 1100 (Nanodrop Technologies), so se gibale med 50 in 500 ng/μl z razmerjem absorbanca $A_{260/280}$ med 1,7 in 1,9.

4.4.2 Določevanje števila kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa

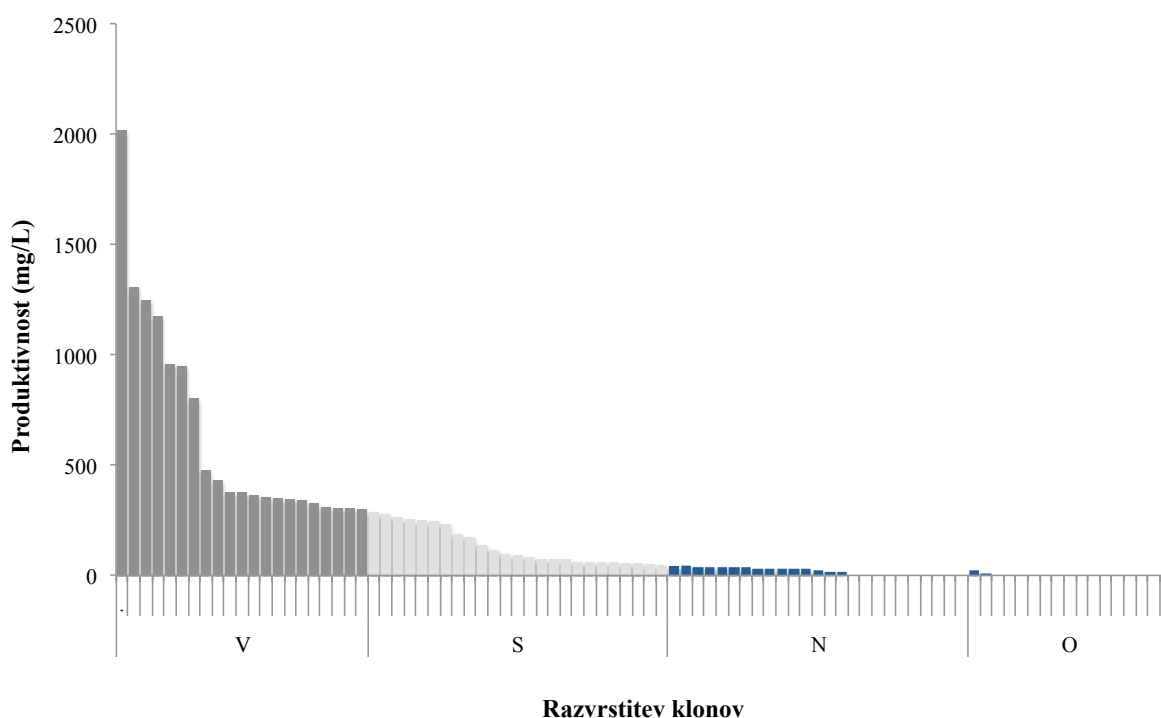
Z analizo qPCR in preračunom kopij transgenov na haploidni genom ($n=1$) smo pri analiziranih klonih potrdili, da večina vsebuje gen za Lv in tudi za Tv mAb. Za 17 klonov smo ugotovili, da jim manjka ali imajo okvarjeni kopiji obeh genov za Lv in Tv ali enega izmed njih (označeni s sivo v preglednici 20). Vsi kloni z manjkajočim ali okvarjenim genom spadajo v skupino nizko producirajočih klonov (N).

Preglednica 20: Število kopij genov za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo, preračunano na haploidni genom S sivo so označeni kloni, ki jim manjka ali imajo okvarjeni kopiji obeh genov za Lv in Tv ali enega izmed njih. V = visoko producirajoči kloni, S = srednje producirajoči kloni, N = nizko producirajoči kloni, O = kloni z manjkajočima ali okvarjenima Lv in Tv, O_Lv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Lv in O_Tv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Tv.

Table 20: Gene copy numbers for the light (Lv) and heavy (Tv) chain, calculated per haploid genome The clones with a missing or defective gene copy for one of or both light and heavy chain are marked in grey. N = low producing clones, S = medium producing clones, V = high producing clones, O = clones with a defective or missing light and heavy chain, O_Lv = clones with a defective or missing light chain and O_Tv clones with a defective or missing heavy chain.

Cel. linija	Oznaka klona	Št. kopij gena za Tv	Št. kopij gena za Lv	Produkt. skupina	Cel. linija	Oznaka klona	Št. kopij gena za Tv	Št. kopij gena za Lv	Produkt. skupina
CHO der1	G418 P11 1	1,0	0,6	N	CHO der3	G418 P21 2	0,5	0,6	V
	G418 P11 1	0,0	0,0	O		G418 P21 7	0,8	1,3	N
	G418 P11 2	0,3	0,6	S		G418 P21 8	4,6	4,7	V
	G418 P11 2	0,4	0,4	S		G418 P21 1	1,0	1,6	N
	G418 P13 2	1,1	1,1	S		G418 P21 1	1,3	1,4	N
	G418 P13 4	0,3	0,3	N		G418 P23 8	0,3	0,4	S
	G418 P13 1	0,0	0,0	O		G418 P23 1	1,6	1,5	S
	G418 P13 1	0,3	0,4	N		G418 P23 2	1,2	1,2	V
	G418 P14 1	0,0	0,0	O		G418 P24 7	0,3	0,3	N
	G418 P14 1	0,3	0,3	S		G418 P24 2	0,6	0,7	S
	MTX P11 9	0,2	0,3	S		MTX P21 4	0,4	0,5	V
	MTX P11 1	0,9	0,9	S		MTX P21 7	0,4	0,5	S
	MTX P11 1	0,3	0,4	N		MTX P21 2	0,7	0,5	S
	MTX P11 2	0,8	0,9	S		MTX P23 3	1,2	1,3	S
	MTX P13 4	0,4	0,4	V		MTX P23 8	0,7	0,7	S
	MTX P13 1	0,4	0,4	S		MTX P23 1	0,6	0,8	S
	MTX P13 1	0,4	0,4	V		MTX P24 3	1,4	1,3	N
	MTX P13 1	1,5	1,5	V		MTX P24 1	0,4	0,8	S
	MTX P14 2	0,4	0,4	V		MTX P24 2	0,4	0,4	S
	MTX P14 5	0,4	0,5	V		MTX P24 2	0,2	0,2	V
CHO der2	G418 P1 14	1,0	0,0	O (O Tv)	CHO der4	G418 P41 1	0,3	0,0	O (O Tv)
	G418 P1 21	0,6	0,6	N		G418 P42 3	0,5	0,6	N
	G418 P2 3	0,6	0,7	N		G418 P42 7	0,3	0,3	N
	G418 P2 14	0,0	0,0	O		G418 P42 2	1,7	1,9	N
	G418 P2 19	0,7	0,7	N		G418 P44 2	0,2	0,3	N
	G418 P2 22	0,4	0,4	N		G418 P44 2	0,5	0,6	N
	G418 P2 26	0,0	0,0	O		G418 P44 2	1,3	1,4	V
	G418 P3 2	0,4	0,8	N		G418 P45 8	0,3	0,4	S
	G418 P3 5	0,0	0,0	O		G418 P45 1	0,7	0,8	N
	G418 P3 10	0,0	0,0	O		G418 P45 2	0,0	0,0	O
	MTX P1 5	5,5	5,6	N		MTX P41 2	0,3	0,3	S
	MTX P1 7	0,0	0,0	O		MTX P41 1	0,7	0,8	V
	MTX P2 7	1,6	2,1	V		MTX P42 2	0,2	0,2	V
	MTX P2 15	0,4	0,8	N		MTX P42 1	0,0	0,2	O (O Lv)
	MTX P2 18	0,8	0,9	V		MTX P44 1	0,5	0,6	V
	MTX P3 5	1,4	1,6	V		MTX P44 1	0,0	0,0	O
	MTX P3 7	1,3	1,6	V		MTX P44 2	0,6	0,7	V
	MTX P3 9	0,0	0,8	O (O Lv)		MTX P45 6	0,3	0,3	V
	MTX P3 16	1,1	1,1	V		MTX P45 7	1,2	1,7	N
	MTX P3 29	0,0	0,5	O (O Lv)		MTX P45 2	1,2	1,6	N
CHO der6	G418 P33 1	0,3	0,4	S	CHO der6	MTX P32 4	0,5	0,0	O (O Tv)
	G418 P33 2	15,7	16,3	N		MTX P32 2	0,3	0,4	S
	G418 P34 5	0,3	0,0	O (O Tv)		MTX P34 1	1,8	2,0	S
	G418 P34 1	4,7	5,0	S		MTX P34 1	1,4	1,7	N

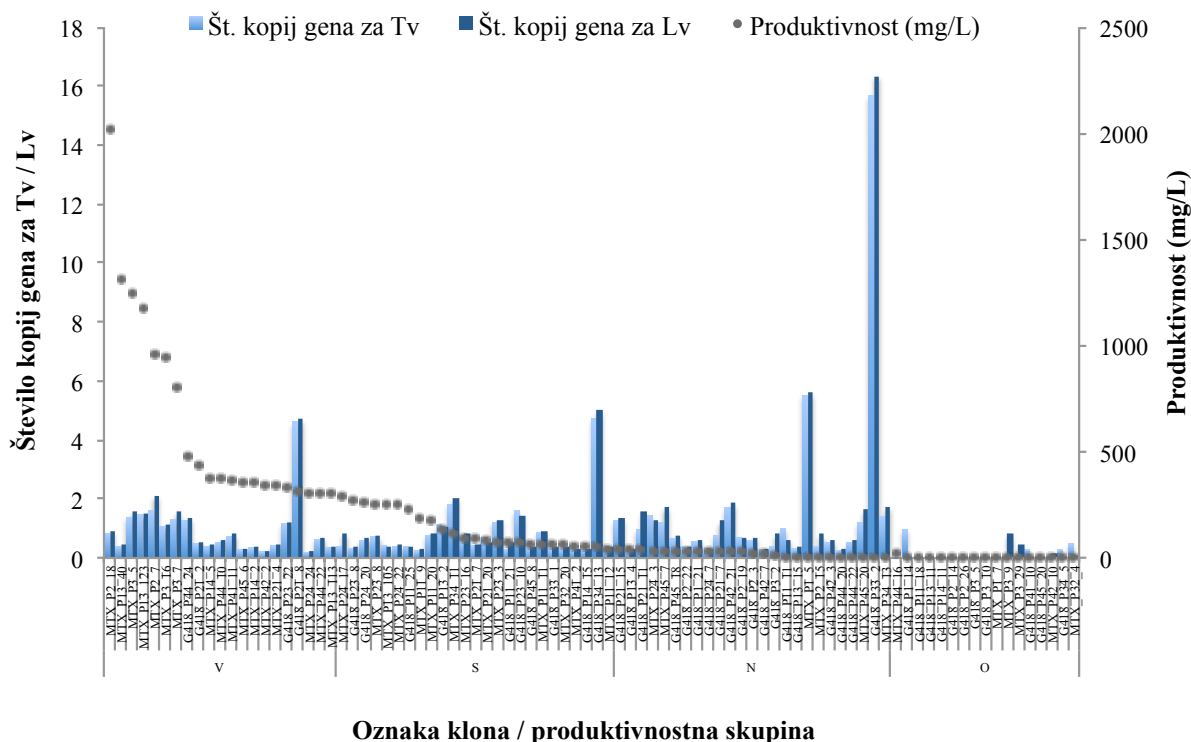
Na sliki 23 je prikazana razvrstitev klonov glede na njihovo produktivnost in tudi glede na to, ali imajo okvarjen oz. manjkajoč zapis za transgen.



Slika 13: Razvrstitev klonov glede na produktivnostno skupino in z upoštevanjem okvarjenosti transgenov
V = visoko producirajoči kloni, S = srednje producirajoči kloni, N = nizko producirajoči kloni, O = kloni z manjkajočima ali okvarjenima genoma za Lv in/ali Tv.

Figure 13: Distribution of clones based on productivity and whether the transgenes are missing/defective
V = high producing clones, S = medium producing clones, N = low producing clones, O = clones with a defective or missing light and/or heavy chain.

Pri klonih, pri katerih smo s qPCR potrdili prisotnost obeh genov, je povprečno število kopij gena za Lv znašalo 1,2, za Tv pa 1,1. Nizko število nakazuje na to, da visoka produktivnost ni nujno povezana s številom kopij v genom vgrajenih transgenov. Odvisnost produktivnosti s številom kopij genov za Lv in Tv prikazuje slika 14.



Slika 14: Produktivnost in število kopij gena za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo v vseh izbranih klonih
V = visoko producirajoči kloni, S = srednje producirajoči kloni, N = nizko producirajoči kloni, O = kloni z manjkajočima ali okvarjenima Lv in/ali Tv.

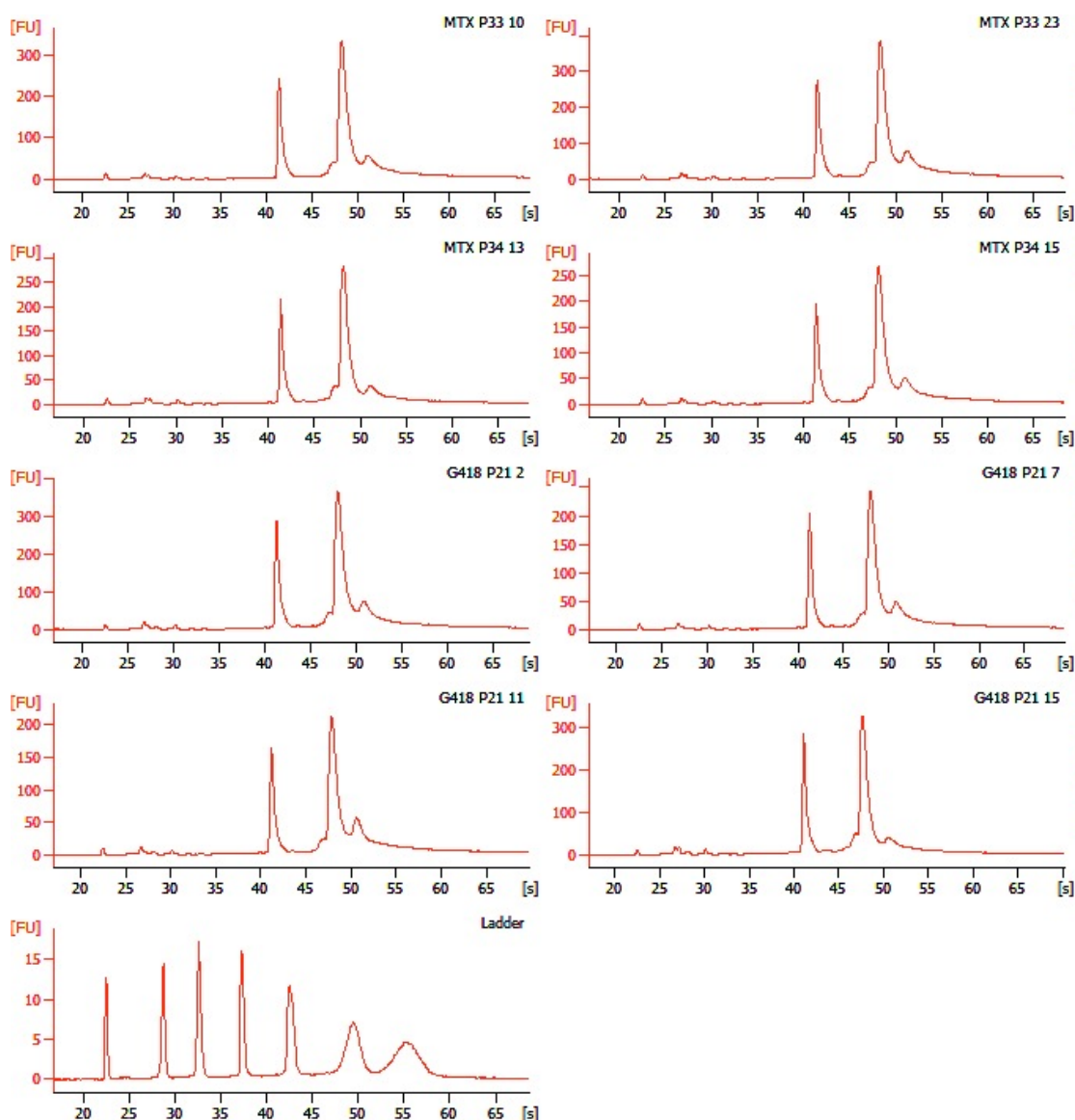
Figure 14: Productivity and gene copy numbers for the light (Lv) and heavy (Tv) chain for all selected clones
V = high producing clones, S = medium producing clones, N = low producing clones, O = clones with a defective or missing light and/or heavy chain.

4.5 ANALIZE NA RAVNI RNA

4.5.1 Mikromreže

4.5.1.1 Izolacija celokupne RNA, sinteza cDNA, priprava aRNA

Spektrofotometrično izmerjene koncentracije izolirane totRNA so bile med 330 in 2560 ng/ μ l z razmerji 260/280 med 2,06 in 2,18, kar ponazarja visoko čistost vzorcev. Integriteto totRNA smo preverili s kapilarno elektroforezo (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies). Vrednosti RIN smo določili za vse izolirane vzorce in so znašale med 9,8 in 10, kar nakazuje na popolnoma nerazgrajen izhodni material. Na sliki 15 je prikazano nekaj značilnih elektroferogramov, ki smo jih dobili pri vzorcih izolirane totRNA. Prvi vrh predstavlja podenoto 18S in drugi vrh podenoto 28S molekul rRNA. Razmerje med njima se nagiba v prid podenote 28S molekul rRNA, kar pomeni, da so naši vzorci visoke kakovosti in nerazgrajeni.



Slika 15: Primer elektroferogramov kapilarne elektroforeze (Bioanalyser) totRNA

Na sliki so prikazani elektroferogrami za 8 vzorcev (oznake so podane v zgornjem levem kotu vsakega elektroferograma) in lestvica velikosti fragmentov (ladder).

Figure 15: Example of electropherograms from capillary electrophoresis (Bioanalyser) of total RNA

Shown are electropherograms for 8 samples (designations are indicated in the in upper left corner of each electropherogram) and the ladder.

Po enakem načelu smo preverili tudi koncentracije in integriteto izolirane aRNA. Koncentracije očiščene aRNA so se gibale med 720 in 2540 ng/ μ l z razmerji med 2,05 in 2,18. Velikost molekul aRNA smo preverili z aparaturo Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Velikosti vzorcev aRNA so bile v razponu med 250–5500 nt, večinoma pa velikosti 850–1500 nt.

4.5.1.2 Hibridizacija

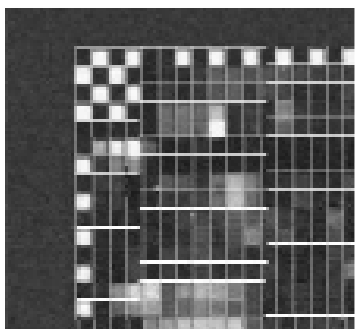
Hibridizacijo na mikromreže smo uspešno izvedli za 88 vzorcev, ki izvirajo iz različnih klonov, in 15 vzorcev, ki izvirajo iz petih starševskih celičnih linij (iz 3 bioloških ponovitev na celično linijo).

4.5.1.3 Preverjanje kakovosti mikromrež

S programom AGCC smo preverili ustreznost intenzitete mikromrež in potrdili odsotnost motečih mehurčkov ali prask.

V programu Expression Console smo preverili:

- Poravnavo mreže s sintetičnim oligonukleotidom B2. Uspešna hibridizacija oligonukleotida B2 je vidna kot izmenjujoči vzorec intenzitet na robovih mikromreže in kot vzorec šahovnice v vsakem kotu mikromrež (slika 16). Signali oligonukleotida B2 so bili ustrezni za vse analizirane mikromreže.
- Vrednosti ozadja (angl. average background – BG avg), ki so znašale med 25 in 40 za vse analizirane vzorce s povprečno vrednostjo 33.
- Kontrole Poly-A (*lys*, *phe*, *thr* in *dap*) so bile zaznane na vseh mikromrežah (angl. present – P) v naraščajočih intenzitetah (*lys* < *phe* < *thr* < *dap*), kar ustreza naraščajočim koncentracijam, ki smo jih dodali v vzorce RNA.
- Hibridizacijske kontrole (*bioB*, *bioC*, *bioD* in *cre*) so bile, kot je zahtevano, prisotne (P) pri vseh analiziranih mikromrežah. Intenziteta njihovega signala je naraščala v ustreznem zaporedju: *bioB* < *bioC* < *bioD* < *cre*.
- Odstotek prisotnih sond (angl. percent present – % P) glede na celotno število sond na mikromreži je za večino vzorcev znašal približno 40 %. Vrednosti med posameznimi mikromrežami so primerljive. Na odstotek vplivajo številni dejavniki: tip celic, biološki ali okoljski dejavniki, tip mikromreže in kakovost RNA. Glede na to, da so mikromreže izdelane tudi na podlagi hrčkovih zaporedij, imata v našem primeru verjetno največji vpliv tip celic in okoljski dejavniki (gojišče, pogoji gojenja itd.).



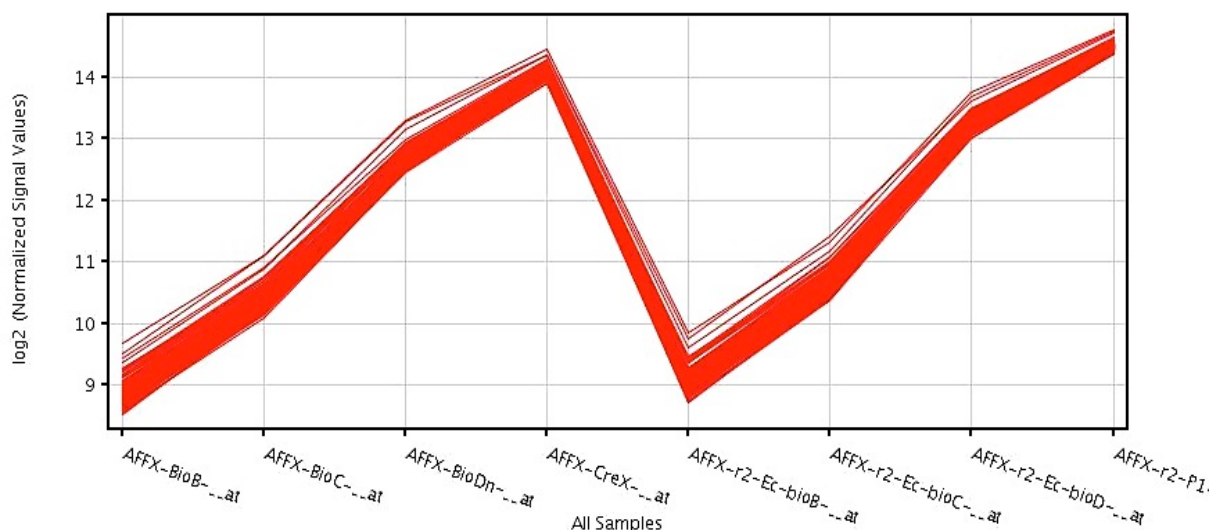
Slika 16: Primer uspešne hibridizacije oligonukleotida B2 na robovih in v kotu mikromrež

Figure 16: Example of successful B2 hybridisation illuminating the corner and edges of the microarray

Primer poročila kontrole kakovosti s programom Expression Console je prikazan v prilogi F.

Nadaljevali smo v programu GeneSpring GX in za vseh 88 mikromrež naenkrat izvedli normalizacijo na podlagi algoritma RMA. Proizvajalec mikromrež Affymetrix je naknadno obvestil, da je 17367 setov sond najverjetneje napačnih in da priporočajo njihovo izključitev iz nadaljnjih analiz. Ker so naštetí seti sond večinoma brez signalov in bi lahko vplivali na izid normalizacije, smo »napačne« sete sond izločili še pred normalizacijo. Normalizacijo smo tako izvedli na 43856 setih sond (izmed 61223).

Program GeneSpring GX med postopkom normalizacije in kontrolo kakovosti mikromrež prikaže tudi kontrolo hibridizacije (slika 17). Logaritmirane in normalizirane intenzitete signalov hibridizacijskih kontrol naraščajo v ustreznem zaporedju, kar je skladno z rezultati iz programa Expression Console.



Slika 17: Kontrola hibridizacije

Učinkovitost hibridizacije *BioB* predstavljata oznaki AFFX-BioB-...at in AFFX-r2-Ec-bioB-...at, *BioC* oznaki AFFX-BioC-...at in AFFX-r2-Ec-bioC-...at, *BioD* oznaki AFFX-BioDn-...at in AFFX-r2-Ec-bioD-...at ter *cre* oznaki AFFX-CreX-...at in AFFX-r2-P1.

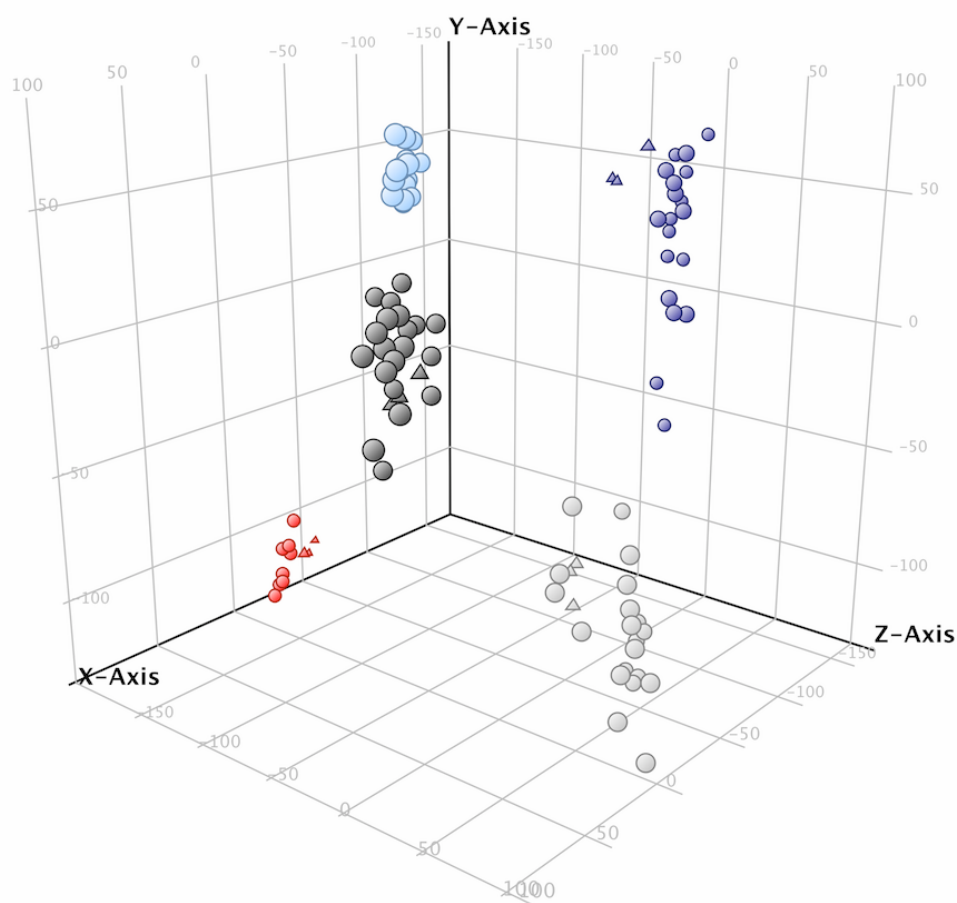
Figure 17: Hybridisation control

BioB is represented by AFFX-BioB-...at and AFFX-r2-Ec-bioB-...at, *BioC* by AFFX-BioC-...at and AFFX-r2-Ec-bioC-...at, *BioD* by AFFX-BioDn-...at and AFFX-r2-Ec-bioD-...at, *cre* by AFFX-CreX-...at and AFFX-r2-P1.

Preverili smo tudi razmerje intenzitet 3':5' internih kontrol, ki je bilo pri vseh analiziranih vzorcih manjše kot 3 (v povprečju 1). Nizko razmerje nakazuje na visoko kakovost vzorcev (nerazgrajena RNA), kar smo potrdili tudi z meritvami z napravo Bioanalyser.

4.5.1.4 Obdelava podatkov

Nadaljevali smo z analizo glavnih komponent vseh vzorcev (PCA). Rezultati so prikazani na sliki 18. Oblikovalo se je 5 jasnih in ločenih skupin, kar ustreza posameznim celičnim linijam CHO.

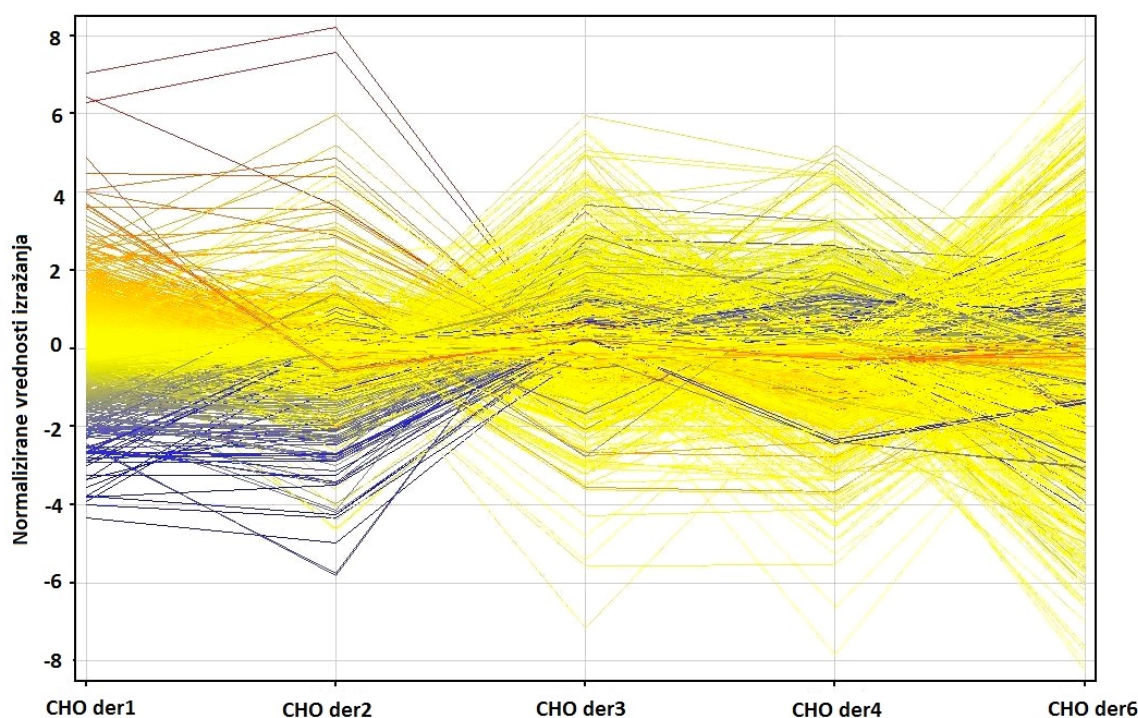


Slika 18: Analiza glavnih komponent (PCA) vseh vzorcev, ki temelji na podatkih celokupnega transkriptoma. Barve predstavljajo posamezno celično linijo CHO: temno siva, CHO der1; svetlo modra, CHO der2; svetlo siva, CHO der3; temno modra, CHO der4; rdeča, CHO der6. Krogi predstavljajo producirajoče celične linije (kloni, ki proizvajajo mAb), trikotniki pa starševske celične linije.

Figure 18: Principal component analysis (PCA) of all samples based on the whole-genome transcriptomic data

Each cell line has a distinct colour: dark grey, CHO der1; light blue, CHO der2; light grey, CHO der3; dark blue, CHO der4; red, CHO der6. Circles represent mAb producing cell clones, and triangles represent parental cell lines.

Ujemajoče rezultate z analizo PCA kaže tudi profilni graf (angl. profile plot) na sliki 19. Opazne so pomembne razlike v ekspresijskem profilu med posameznimi celičnimi linijami CHO. Z obeh grafov (sliki 18 in 19) je razvidno, da sta si najbolj podobni celični liniji CHO der1 in CHO der2, najbolj različna od vseh pa je CHO der6.



Slika 19: Profil izražanja genov pri različnih celičnih linjah

Profil izražanja genov je prikazan za vseh 103 vzorcev. Vsaka črtica predstavlja en set sond. Prikazani so vsi seti sond (43686), na katerih je bila izvedena normalizacija. Barve so določene glede na izražanje genov pri celični liniji CHO der1. V rdečem so prikazani seti sond, ki imajo višje izražanje, v modrem pa nižje izražanje genov glede na preostale celične linije.

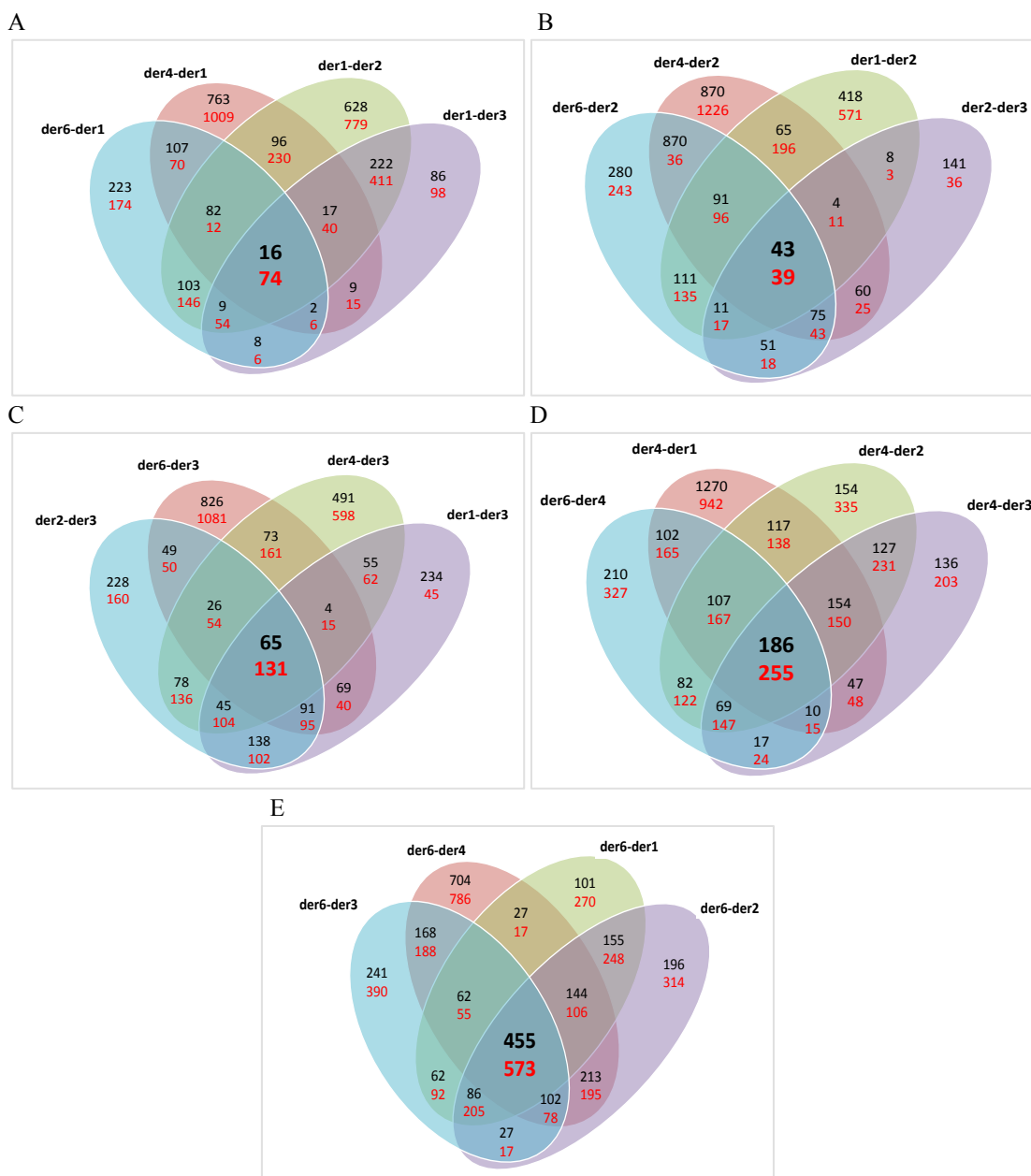
Figure 19: Profile plot for different cell lines

Profiles are shown for 103 samples. Each profile line represents one of a total of 43686 probe sets shown. Lines are coloured based on the CHO der1 cell line expression profile. The probe sets in red are specific for up-regulation and those in blue for down-regulation compared to other cell lines.

Vsi analizirani vzorci (103) so bili ustrezni glede kontrole kakovosti, zato smo v normalizacijski datoteki vse obdržali in analizo nadaljevali z vsemi.

4.5.1.4.1 Primerjalna analiza transkriptoma različnih starševskih celičnih linij

Že analiza PCA (slika 18) je nakazala, da so starševske celične linije po ekspresijskem profilu precej različne. Nadaljnji dokaz, da starševske celične linije lahko ločimo glede na njihov ekspresijski profil, je tudi število različno izraženih genov med pari celičnih linij (slika 20). Vennovi diagrami kot grafični prikaz odnosa med množicami predstavljajo vse možne povezave oz. skupno število setov sond med različnimi skupinami primerjav. Število na sredini vennovih diagramov predstavlja gene, ki imajo zvišano/znižano izražanje edinstveno le pri določeni celični liniji in je povzeto tudi v preglednici 21. Izhodno število setov sond, na podlagi katerih so nastali vennovi diagrami, je obsegalo 31493 setov sond.



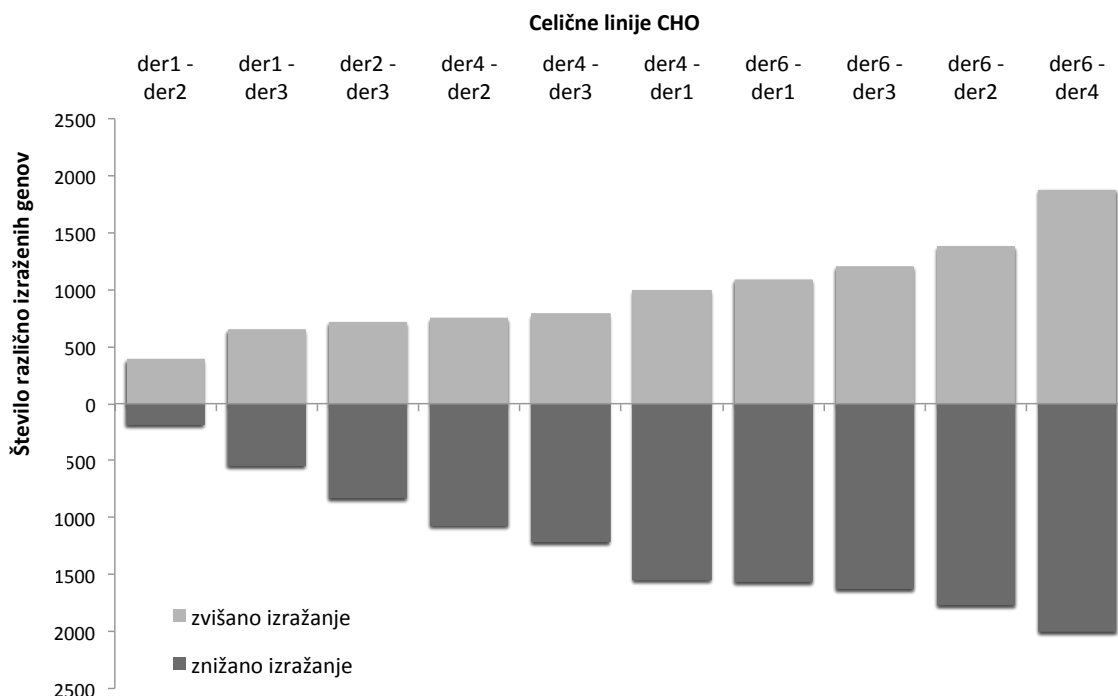
Slika 20: Vennovi grafikoni, ki predstavljajo število, značilno različno izraženih setov sond za vse možne pare celičnih linij CHO

Za mejo statistične značilnosti smo upoštevali naslednje pogoje: $\log_2FC(abc) > 1$, FC – fold change ter vrednost $p \leq 0,05$. S črno je označeno število setov sond z zvišanim izražanjem, z rdečo pa z znižanim izražanjem. Primerjava celične linije (A) CHO der1 proti vsem preostalim celičnim linijam, (B) CHO der2 proti vsem preostalim celičnim linijam, (C) CHO der3 proti vsem preostalim celičnim linijam, (D) CHO der4 proti vsem preostalim celičnim linijam in (E) CHO der6 proti vsem preostalim celičnim linijam.

Figure 20: Venn diagrams representing the number of significantly differentially expressed probe sets for all combinations of possible CHO cell line pairs

The following rules of statistical significance were used: $\log_2FC(abc) > 1$, FC – fold change, P-value ≤ 0.05 . The black numbers represent up-regulated probe sets and the red down-regulated probe sets. Comparison of (A) CHO der1 vs other cell lines, (B) CHO der2 vs other cell lines, (C) CHO der3 vs other cell lines, (D) CHO der4 vs other cell lines and (E) CHO der6 vs other cell lines.

Števek vseh setov sond, ki so statistično različno izražene za vsak posamezen primerjan par starševskih celičnih linij, je povzet na sliki 21.



Slika 21: Število različno izraženih setov sond, ki smo jih zaznali z analizo mikromrež pri primerjavi različnih parov starševskih celičnih linij

Za mejo statistične značilnosti smo upoštevali naslednje pogoje: $\log_2FC(abc) > 1$, FC – fold change ter vrednost $p \leq 0,05$. Svetlo siva barva označuje število setov sond z zvišanim, temno siva barva število z znižanim izražanjem v posamezni primerjavi.

Figure 21: Number of differentially expressed probe sets identified by microarray analysis in the comparison of different pairs of parental cell-lines

The following rules of statistical significance were used: $\log_2FC(abc) > 1$, FC – fold change, P-value ≤ 0.05 . Light grey represents up-regulated genes and dark grey down-regulated genes.

Nadalje smo s primerjavo vsake izmed starševskih celičnih linij z vsemi preostalimi identificirali sete sond, ki so edinstveno različno izraženi v posamezni starševski celični liniji CHO (preglednica 21).

Preglednica 21: Število setov sond, značilnih za posamezno celično linijo glede na njihovo izraženost. Za mejo statistične značilnosti smo upoštevali naslednje pogoje: zvišano izražanje, $\log_2FC > 1$ in znižano izražanje, $\log_2FC < -1$; vrednost $p \leq 0,05$. Vsako izmed starševskih celičnih linij smo primerjali z vsemi preostalimi.

Table 21: Number of differentially expressed probe sets unique for each parental cell line

The following rules of statistical significance were used: up-regulated, $\log_2FC > 1$ and down-regulated, $\log_2FC < -1$; P-value ≤ 0.05 . Each parental cell line was compared to the group of four other cell lines.

Celična linija	Število dinstveno izraženih setov sond	
	Zvišano izražanje	Znižano izražanje
CHO der1	16	74
CHO der2	43	39
CHO der3	65	131
CHO der4	186	255
CHO der6	455	573

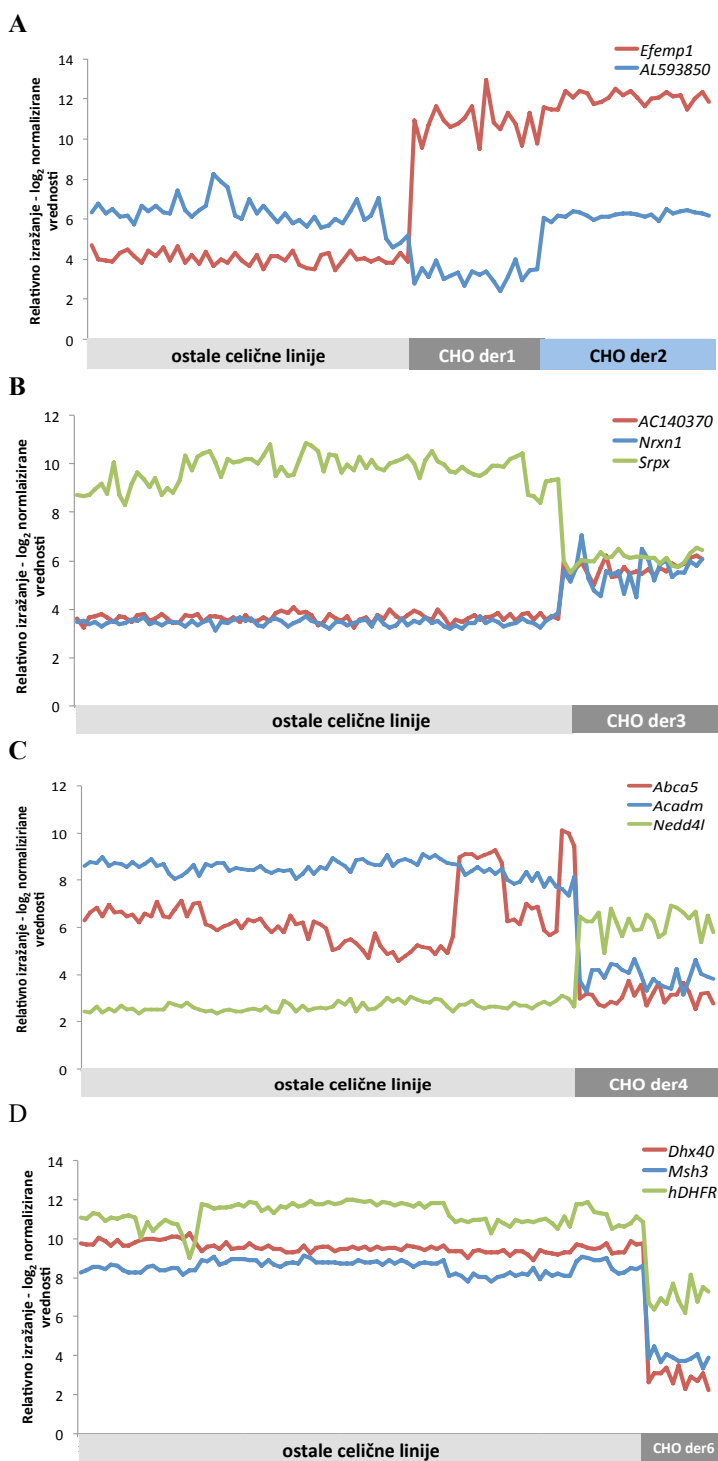
Med seti sond, ki so zbrani v preglednici 21, smo z nadaljnjo razširjeno analizo zožali nabor genov, ki se edinstveno izražajo za posamezno celično linijo. V analizo smo poleg starševskih linij vključili tudi pripravljene rekombinantne klone. V statističnem modelu smo primerjali rekombinantne klone, izhajajoče iz posamezne starševske linije, in tudi osnovne starševske celične linije z vsemi preostalimi kloni in starševskimi celičnimi linijami (npr. kloni CHO der3 in starševska celična linija CHO der3 proti vsem preostalim klonom in starševskim celičnim linijam). Zvišali smo meje za statistično značilno različno izražanje: zvišano izražanje, $\log_2FC > 2$ in znižano izražanje, $\log_2FC < -2$; vrednost $p \leq 0,05$ ter uvedli nov kriterij – razliko med minimalno in maksimalno vrednostjo izražanja gena znotraj posamezne skupine (razlika min-max > 1). Število genov, ki so značilni za posamezno celično linijo in s katerimi lahko ločujemo med njimi, se je bistveno zmanjšalo zaradi razširitve analize (vključitev klonov iz posamezne starševske celične linije), strožjih pogojev filtriranja in tudi zaradi dejstva, da je za določen gen na mikromreži prisotnih več setov sond, vendar smo s tem povečali robustnost dobljenih rezultatov. Vsi edinstveni geni, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije, so zbrani v preglednici 22.

Edinstveni geni za CHO der3 – der6 (preglednica 22) izvirajo iz primerjav posamezne celične linije s preostalimi celičnimi linijami. Pri primerjavi CHO der1 ali CHO der2 s preostalimi celičnimi linijami edinstvenih genov ni bilo, zato smo obe skupaj najprej primerjali z vsemi preostalimi celičnimi linijami, nato pa še CHO der1 in CHO der2 med seboj.

Preglednica 22: Geni, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije
Table 22: Genes that differentiate the analysed CHO cell lines

Celična linija	Primerjava	Izražanje gena	Ime gena
CHO der1 & CHO der2	CHO der1 & der2 – preostale cel. linije	zvišano izražanje	<i>Efemp1</i> , <i>AW551984</i> , <i>NM_001109344.2</i> , <i>Casp12</i> , <i>Epas1</i>
		znižano izražanje	<i>NA_1</i>
	CHO der1 – CHO der2	zvišano izražanje	<i>AC148014.3</i> , <i>Krt80</i> , <i>AL593850.10</i> , <i>Dtna</i>
		znižano izražanje	<i>Murc</i>
CHO der3	CHO der3 – preostale cel. linije	zvišano izražanje	<i>Bex1</i> , <i>Try4</i> , <i>Pcdhb17</i> , <i>CS392375.1</i> , <i>AZ814815 (=Nrnx1)</i> , <i>AC124605.4</i> , <i>AC140370.3</i>
		znižano izražanje	<i>Gad2</i> , <i>Casc4</i> , <i>Atxn711</i> , <i>Srpx</i>
CHO der4	CHO der4 – preostale cel. linije	zvišano izražanje	<i>Krt7</i> , <i>Aldh18a1</i> , <i>Ampd3</i> , <i>AC107742.10</i> , <i>Nedd4l</i> , <i>AL138881.12</i> , <i>A230050P20Rik</i>
		znižano izražanje	<i>Naprt1</i> , <i>Gbp2</i> , <i>NA_2</i> , <i>Abca5</i> , <i>Ifi2711</i> , <i>Mfsd6</i> , <i>Tmeff2</i> , <i>1110058L19Rik</i> , <i>Acadm</i> , <i>Hnrnpab</i>
CHO der6	CHO der6 – preostale cel. linije	zvišano izražanje	<i>Wisp1</i> , <i>Cst3</i> , <i>Cadm1</i> , <i>Trpc3</i> , <i>Dap</i> , <i>GA088319.1</i> , <i>AC113081.2</i> , <i>GH501126.1</i> , <i>Nrn1</i> , <i>Aebp1</i> , <i>AC124379.3</i> , <i>Pon2</i> , <i>Numb</i> , <i>Usp22</i> , <i>Lpl</i> , <i>Dpy19l2</i> , <i>Car13</i> , <i>Cdh2</i> , <i>Col25a1</i> , <i>AC102091.7</i> , <i>Bgn</i> , <i>As3mt</i> , <i>Mmp3</i> , <i>AC112791.3</i> , <i>Abca5</i> , <i>Htr3a</i> , <i>Ckmt1</i> , <i>Sla</i> , <i>Nol11</i> , <i>Itga6</i> , <i>CT009539.5</i> , <i>Trib2</i> , <i>Slco3a1</i> , <i>Odz4</i> , <i>Npas2</i> , <i>Zfr2</i> , <i>Trp63</i> , <i>EZ735130.1</i> , <i>GA115663.1</i> , <i>Setd4</i> , <i>NA_3</i> , <i>Slc26a4</i> , <i>Upp1</i> , <i>Plxdc1</i> , <i>Sigirr</i> , <i>AL591854.18</i>
		znižano izražanje	<i>GH491588.1</i> , <i>Dnaja1</i> , <i>Arhgap32</i> , <i>Hoxc10</i> , <i>Swap70</i> , <i>Lrfr3</i> , <i>Taf9b</i> , <i>Ppm1k</i> , <i>Akt3</i> , <i>DH939714.1</i> , <i>Ebf3</i> , <i>DH740532.1</i> , <i>Acads</i> , <i>Svil</i> , <i>Ttc38</i> , <i>Hivep3</i> , <i>Hoxc6</i> , <i>Nr3c2</i> , <i>Dlc1</i> , <i>Ggnbp1</i> , <i>Sytl4</i> , <i>Fam131a</i> , <i>Fsd11</i> , <i>Dlx4</i> , <i>Gm15051</i> , <i>5730446D14Rik</i> , <i>AI076993.1</i> , <i>AC151908.1</i> , <i>Dfna5</i> , <i>Morn4</i> , <i>FT035468.1</i> , <i>Mllt10</i> , <i>Hoxc4</i> , <i>Vopp1</i> , <i>Pcgf6</i> , <i>hDHFR</i> , <i>Pcdh19</i> , <i>Meis1</i> , <i>Rtkn2</i> , <i>Zfyve16</i> , <i>NG_005612.1</i> , <i>Hdgfrp3</i> , <i>Eif4e3</i> , <i>Hoxa5</i> , <i>St3gal6</i> , <i>Lrrn3</i> , <i>Uck1</i> , <i>Kctd12b</i> , <i>Msh3</i> , <i>Camk2n1</i> , <i>Nipal3</i> , <i>Gnpda2</i> , <i>Mbp</i> , <i>E130203B14Rik</i> , <i>Chic1</i> , <i>AC139755.3</i> , <i>Ptprg</i> , <i>Epb4.1</i> , <i>Tmeff1</i> , <i>4930572J05Rik</i> , <i>Rcn2</i> , <i>1500009L16Rik</i> , <i>Fam151b</i> , <i>Zfp365</i> , <i>Pycard</i> , <i>Fbxl16</i> , <i>CS396457.1</i> , <i>AC102128.18</i> , <i>1110067D22Rik</i> , <i>Snai2</i> , <i>Stard4</i> , <i>Ptpla</i> , <i>Tes</i> , <i>Gpr27</i> , <i>NA_4</i> , <i>Rarres2</i> , <i>Kdelr3</i> , <i>Maged1</i> , <i>Dhx40</i> , <i>Kitl</i> , <i>Btg3</i> , <i>Cnrip1</i> , <i>Mpp6</i>

Ker je za ločevanje med posameznimi celičnimi linijami zadostno manjše število edinstvenih genov, smo izmed zbranih v preglednici 22 izbrali 11 genov. Za te smo se odločili, ker so v določeni skupini kazali popolno odsotnost/prisotnost izražanja, ne samo zvišano/znižano izražanje. Za vsako celično linijo smo izbrali po 3 gene (*AC140370*, *Nrnx1* in *Srpx* za CHO der3; *Abca5*, *Acadm* in *Nedd4l* za CHO der4; *Dhx40*, *Msh3* in *hDHFR* za CHO der6), razen za celični liniji CHO der1 in CHO der2, pri katerih smo izbrali skupaj dva gena (*Efemp1* in *AL593850*). Izražanje izbranih genov je prikazano na sliki 22.



Slika 22: Relativno izražanje genov, izbranih za ločevanje med celičnimi linijami

Prikazane so log₂ normalizirane vrednosti rezultatov poskusa z mikromrežami. (A) Geni za ločevanje CHO der1 & CHO der2; (B) Geni za ločevanje CHO der3; (C) Geni za ločevanje CHO der4; (D) Geni za ločevanje CHO der6.

Figure 22: Relative expression of genes unique for each analysed cell line

Shown are log₂ normalised values obtained with microarrays. (A) Genes unique for CHO der1 & CHO der2; (B) Genes unique for CHO der3; (C) Genes unique for CHO der4; (D) Genes unique for CHO der6.

Cela imena oz. opisi izbranih genov so prikazani v preglednici 33.

Preglednica 23: Opis funkcije genov, izbranih za ločevanje med celičnimi linijami
Table 23: Description of gene functions for genes selected as unique for a specific cell line

Ime gena	Opis funkcije gena
<i>Efemp1</i>	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 gene
<i>AL593850</i>	unknown
<i>AC140370</i>	unknown
<i>Nrxn1</i>	neurexin I gene
<i>Srpx</i>	sushi-repeat-containing protein gene
<i>Abca5</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5 gene
<i>Acadm</i>	acyl-coenzyme A dehydrogenase, medium chain gene
<i>Nedd4l</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4-like gene
<i>Dhx40</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 gene
<i>Msh3</i>	mutS homolog 3 (E. coli) gene
<i>DHFR</i>	dihydrofolate reductase gene (hamster)

4.5.1.4.1.1 Obogatitvena analiza na ravni procesov (GSEA)

Rezultati, pridobljeni s programom GSEA, oz. značilno zastopane funkcionalne skupine genov pri posamezni starševski celični liniji CHO so prikazani v preglednicah od 24 do 33. Rezultati izražanja skupin genov so razvrščeni glede na njihovo molekularno funkcijo, biološki proces, v katerega so geni vključeni, ter celično komponento, v katerem produkti genov delujejo.

Skupine genov smo dobili z upoštevanjem naslednjih mej: vrednost $p < 0,05$ in korekcijo za dovoljeno stopnjo lažno pozitivnih rezultatov $FDR < 0,05$ (angl. false discovery rate). Rezultati so razporejeni po vrsti glede na normalizirano oceno obogatitve ali NES (angl. normalized enrichment score), ki je bila pri vseh naštetih skupinah višja od 1,7 (pri skupinah genov z zvišanim izražanjem) oz. nižja od -1,7 (pri skupinah genov z znižanim izražanjem). Pri celični liniji CHO der3 skupin genov s povišanim izražanjem z upoštevanjem omenjenih parametrov obogatitve na ravni procesov nismo zaznali.

Preglednica 24: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der1 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost FDR $< 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 24: Functional enrichment of up-regulated genes at CHO der1 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and FDR < 0.05 . The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Zvišano izražanje pri celični liniji CHO der1 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0005578 proteinaceous extracellular matrix	0005201 extracellular matrix structural constituent	0008045 motor axon guidance
0031012 extracellular matrix	0046332 SMAD binding	0043277 apoptotic cell clearance
0005765 lysosomal membrane	0005024 transforming growth factor beta-activated receptor activity	0030199 collagen fibril organization
0005788 endoplasmic reticulum lumen	0019838 growth factor binding	0071222 cellular response to lipopolysaccharide
0005615 extracellular space	0008093 cytoskeletal adaptor activity	0007040 lysosome organization
0005902 microvillus	0005518 collagen binding	0007517 muscle organ development
0044444 cytoplasmic part	0008201 heparin binding	0007420 brain development
0032580 Golgi cisterna membrane	0008083 growth factor activity	0043086 negative regulation of catalytic activity
	0003707 steroid hormone receptor activity	0050731 positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation
	0004364 glutathione transferase activity	0043588 skin development
	0004675 transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	0045723 positive regulation of fatty acid biosynthetic process
	0017025 TBP-class protein binding	0007520 myoblast fusion
	0004197 cysteine-type endopeptidase activity	0032570 response to progesterone stimulus
	0005544 calcium-dependent phospholipid binding	0019221 cytokine-mediated signaling pathway
	0005539 glycosaminoglycan binding	0034394 protein localization to cell surface
	0004879 ligand-activated sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity	0009612 response to mechanical stimulus
	0004888 transmembrane signaling receptor activity	0007229 integrin-mediated signaling pathway
	0043169 cation binding	0008344 adult locomotory behavior
	0001948 glycoprotein binding	0007160 cell-matrix adhesion
		0071285 cellular response to lithium ion
		0007155 cell adhesion
		0007179 transforming growth factor beta receptor signaling pathway
		0009408 response to heat
		0043434 response to peptide hormone stimulus
		0050830 defense response to Gram-positive bacterium
		0045022 early endosome to late endosome transport
		0048598 embryonic morphogenesis
		0009314 response to radiation
		0019915 lipid storage
		0042742 defense response to bacterium
		0043123 positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
		0007281 germ cell development
		0001764 neuron migration
		0030155 regulation of cell adhesion
		0007259 JAK-STAT cascade
		0042060 wound healing
		0051085 chaperone mediated protein folding requiring cofactor
		0043330 response to exogenous dsRNA
		0006044 N-acetylglucosamine metabolic process
		0048870 cell motility

Preglednica 25: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der1 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 25: Functional enrichment of down-regulated genes at CHO der1 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der1 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
/	/	0009880 embryonic pattern specification 0010467 gene expression

Preglednica 26: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der2 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 26: Functional enrichment of up-regulated genes at CHO der2 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Zvišano izražanje pri celični liniji CHO der2 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
/	/	0006310 DNA recombination

Preglednica 27: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der2 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 27: Functional enrichment of down-regulated genes at CHO der2 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der2 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0005839 proteasome core complex	0008009 chemokine activity	0030593 neutrophil chemotaxis
	0004364 glutathione transferase activity	0045768 positive regulation of anti-apoptosis
	0005230 extracellular ligand-gated ion channel activity	
	0004298 threonine-type endopeptidase activity	
	0034450 ubiquitin-ubiquitin ligase activity	
	0030552 cAMP binding	

Preglednica 28: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der3 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 28: Functional enrichment of down-regulated genes at CHO der3 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der3 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0005578 proteinaceous extracellular matrix	0005518 collagen binding	0008360 regulation of cell shape
0031012 extracellular matrix	0016504 peptidase activator activity	0007160 cell-matrix adhesion
0005840 ribosome	0004812 aminoacyl-tRNA ligase activity	0042177 negative regulation of protein catabolic process
0005912 adherens junction	0003735 structural constituent of ribosome	0006412 translation
0019861 flagellum	0005539 glycosaminoglycan binding	0034394 protein localization to cell surface
0005916 fascia adherens	0051015 actin filament binding	0071375 cellular response to peptide hormone stimulus
	0008201 heparin binding	0034976 response to endoplasmic reticulum stress
	0005520 insulin-like growth factor binding	0006418 tRNA aminoacylation for protein translation
	0017154 semaphorin receptor activity	0031532 actin cytoskeleton reorganization
	0004467 long-chain fatty acid-CoA ligase activity	0010952 positive regulation of peptidase activity
	0043548 phosphatidylinositol 3-kinase binding	0045597 positive regulation of cell differentiation
	0050840 extracellular matrix binding	0071407 cellular response to organic cyclic compound
	0043169 cation binding	0006953 acute-phase response
	0002020 protease binding	0001890 placenta development
	0005328 neurotransmitter:sodium symporter activity	0042060 wound healing
	0016564 transcription repressor activity	0043113 receptor clustering
		0042325 regulation of phosphorylation
		0042098 T cell proliferation
		0050919 negative chemotaxis
		0001101 response to acid
		0045022 early endosome to late endosome transport
		0000187 activation of MAPK activity
		0001558 regulation of cell growth
		0042113 B cell activation
		0048745 smooth muscle tissue development
		0007569 cell aging
		0009612 response to mechanical stimulus

Preglednica 29: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der4 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 29: Functional enrichment of up-regulated genes at CHO der4 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Zvišano izražanje pri celični liniji CHO der4 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0005681 spliceosomal complex	0030676 Rac guanyl-nucleotide exchange factor activity	0006260 DNA replication
0005694 chromosome	0003743 translation initiation factor activity	0006364 rRNA processing
0000793 condensed chromosome	0003735 structural constituent of ribosome	0051028 mRNA transport
0015934 large ribosomal subunit	0004003 ATP-dependent DNA helicase activity	0008380 RNA splicing
0005643 nuclear pore	0016303 1-phosphatidylinositol-3-kinase activity	0006397 mRNA processing
0005840 ribosome	0043022 ribosome binding	0000132 establishment of mitotic spindle orientation
0071339 MLL1 complex		0006164 purine nucleotide biosynthetic process
0005852 eukaryotic translation initiation factor 3 complex		0016571 histone methylation
0000780 condensed nuclear chromosome, centromeric region		0000077 DNA damage checkpoint
0042645 mitochondrial nucleoid		0031572 G2/M transition DNA damage checkpoint
		0030902 hindbrain development
		0006406 mRNA export from nucleus
		0042254 ribosome biogenesis
		0006414 translational elongation
		0006413 translational initiation
		0006302 double-strand break repair
		0043967 histone H4 acetylation

Preglednica 30: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der4 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost FDR $< 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 30: Functional enrichment of down-regulated genes at CHO der4 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and FDR < 0.05 . The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der4 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0005578 proteinaceous extracellular matrix	0008201 heparin binding	0006955 immune response
0005765 lysosomal membrane	0005178 integrin binding	0007155 cell adhesion
0031012 extracellular matrix	0016798 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	0006695 cholesterol biosynthetic process
0005764 lysosome	0004888 transmembrane signaling receptor activity	0001837 epithelial to mesenchymal transition
0005615 extracellular space	0019838 growth factor binding	0019221 cytokine-mediated signaling pathway
0042612 MHC class I protein complex	0050840 extracellular matrix binding	0030155 regulation of cell adhesion
0009897 external side of plasma membrane	0051015 actin filament binding	0007173 epidermal growth factor receptor signaling pathway
0008250 oligosaccharyltransferase complex	0005201 extracellular matrix structural constituent	0016485 protein processing
0034361 very-low-density lipoprotein particle	0005125 cytokine activity	0006869 lipid transport
0031902 late endosome membrane	0005154 epidermal growth factor receptor binding	0043277 apoptotic cell clearance
0005887 integral to plasma membrane	0030169 low-density lipoprotein particle binding	0009725 response to hormone stimulus
0005604 basement membrane	0043236 laminin binding	0007040 lysosome organization
0030315 T-tubule	0004553 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	0019882 antigen processing and presentation
0032580 Golgi cisterna membrane	0043169 cation binding	0001755 neural crest cell migration
0000139 Golgi membrane	0003995 acyl-CoA dehydrogenase activity	0032570 response to progesterone stimulus
0005788 endoplasmic reticulum lumen	0000062 fatty-acyl-CoA binding	0001889 liver development
0031966 mitochondrial membrane	0016810 hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	0070328 triglyceride homeostasis
0005605 basal lamina	0016627 oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	0071222 cellular response to lipopolysaccharide
0055038 recycling endosome membrane	0005520 insulin-like growth factor binding	0005975 carbohydrate metabolic process
0009986 cell surface	0005024 transforming growth factor beta-activated receptor activity	0007218 neuropeptide signaling pathway
0005776 autophagic vacuole	0004197 cysteine-type endopeptidase activity	0030511 positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway
0030139 endocytic vesicle	0045296 cadherin binding	0033344 cholesterol efflux
0031982 vesicle	0015171 amino acid transmembrane transporter activity	0007157 heterophilic cell-cell adhesion
	0004180 carboxypeptidase activity	0019915 lipid storage
	0004364 glutathione transferase activity	0030194 positive regulation of blood coagulation
	0008083 growth factor activity	0043123 positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
	0050660 flavin adenine dinucleotide binding	0007584 response to nutrient
	0005102 receptor binding	0006508 proteolysis
	0005041 low-density lipoprotein receptor activity	0032755 positive regulation of interleukin-6 production
	0004675 transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	0006914 autophagy
	0004571 mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	0007517 muscle organ development
	0030246 carbohydrate binding	0001958 endochondral ossification
	0004871 signal transducer activity	0007229 integrin-mediated signaling pathway
	0005539 glycosaminoglycan binding	0030968 endoplasmic reticulum unfolded protein response
	0005518 collagen binding	0051384 response to glucocorticoid stimulus

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 30: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der4 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der4 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
	0001948 glycoprotein binding	0043085 positive regulation of catalytic activity
	0004497 monooxygenase activity	0032868 response to insulin stimulus
	0008289 lipid binding	0007259 JAK-STAT cascade
	0004879 ligand-activated sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor	0043434 response to peptide hormone stimulus
	0009055 electron carrier activity	0046688 response to copper ion
	0030165 PDZ domain binding	0034446 substrate adhesion-dependent cell spreading
	0004497 monooxygenase activity	0016042 lipid catabolic process
	0008289 lipid binding	0009617 response to bacterium
	0004879 ligand-activated sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor	0070542 response to fatty acid
	0009055 electron carrier activity	0046847 filopodium assembly
	0030165 PDZ domain binding	0007611 learning or memory
		0032760 positive regulation of tumor necrosis factor production
		0001503 ossification
		0043407 negative regulation of MAP kinase activity
		0010595 positive regulation of endothelial cell migration
		0010670 positive regulation of oxygen and reactive oxygen species metabolic process
		0007520 myoblast fusion
		0014070 response to organic cyclic compound
		0030334 regulation of cell migration
		0030199 collagen fibril organization
		0034394 protein localization to cell surface
		0008203 cholesterol metabolic process
		0030509 BMP signaling pathway
		0001937 negative regulation of endothelial cell proliferation
		0001816 cytokine production
		0009612 response to mechanical stimulus
		0006509 membrane protein ectodomain proteolysis
		0006865 amino acid transport

Preglednica 31: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der6 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 31: Functional enrichment of up-regulated genes at CHO der6 in comparison to all other CHO cell lines

Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Zvišano izražanje pri celični liniji CHO der6 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0031225 anchored to membrane	0008201 heparin binding	0006695 cholesterol biosynthetic process
	0005520 insulin-like growth factor binding	0031668 cellular response to extracellular stimulus
0005604 basement membrane	0050840 extracellular matrix binding	0031532 actin cytoskeleton reorganization
0031012 extracellular matrix	0005328 neurotransmitter:sodium symporter activity	0006836 neurotransmitter transport
	0015171 amino acid transmembrane transporter activity	0050930 induction of positive chemotaxis
0042612 MHC class I protein complex	0051015 actin filament binding	0007157 heterophilic cell-cell adhesion
0005615 extracellular space	0016810 hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	0050919 negative chemotaxis
0005578 proteinaceous extracellular matrix	0008009 chemokine activity	0007266 Rho protein signal transduction
0034361 very-low-density lipoprotein particle		
0045177 apical part of cell	0005518 collagen binding	0001938 positive regulation of endothelial cell proliferation
0016323 basolateral plasma membrane	0004143 diacylglycerol kinase activity	0070555 response to interleukin-1
	0004181 metalloprotease activity	0010811 positive regulation of cell-substrate adh.
0005764 lysosome	0004714 transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	0030511 positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway
	0005506 iron ion binding	0040037 negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway
0005911 cell-cell junction	0045296 cadherin binding	0035121 tail morphogenesis
0005887 integral to plasma membrane	0004861 cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity	0006807 nitrogen compound metabolic process
0043235 receptor complex	0048365 Rac GTPase binding	0006814 sodium ion transport
	0043236 laminin binding	0043407 negative regulation of MAP kinase act.
	0005522 profilin binding	0008202 steroid metabolic process
	0045295 gamma-catenin binding	0007155 cell adhesion
		0045717 negative regulation of fatty acid biosynthetic process
		0007416 synapse assembly
		0006955 immune response
		0001558 regulation of cell growth
		0006916 anti-apoptosis
		0007631 feeding behavior
		0007422 peripheral nervous system development
		0006694 steroid biosynthetic process
		0046580 negative regulation of Ras protein signal transduction
		0007189 adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway
		0006800 oxygen and reactive oxygen species metabolic process
		0019722 calcium-mediated signaling
		0045599 negative regulation of fat cell differentiation
		0006944 cellular membrane fusion
		0007160 cell-matrix adhesion
		0045765 regulation of angiogenesis
		0051899 membrane depolarization
		0060021 palate development
		0042326 negative regulation of phosphorylation
		0008360 regulation of cell shape

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 31: Funkcionalna uvrstitev zvišano izraženih genov pri celični liniji CHO der6 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Zvišano izražanje pri celični liniji CHO der6 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
		0007267 cell-cell signaling
		0001503 ossification
		0043433 negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity
		0048485 sympathetic nervous system develop.

Preglednica 32: Funkcionalna uvrstitev znižano izraženih genov pri celični liniji CHO der6 v primerjavi s preostalimi celičnimi linijami CHO

Izvorni rezultati programa GSEA. Skupine genov smo filtrirali glede na vrednost $p < 0,05$ in vrednost $FDR < 0,05$. Številka pred opisom funkcije predstavlja oznako za gensko ontologijo (angl. gene ontology – GO).

Table 32: Functional enrichment of down-regulated genes at CHO der6 in comparison to all other CHO cell lines

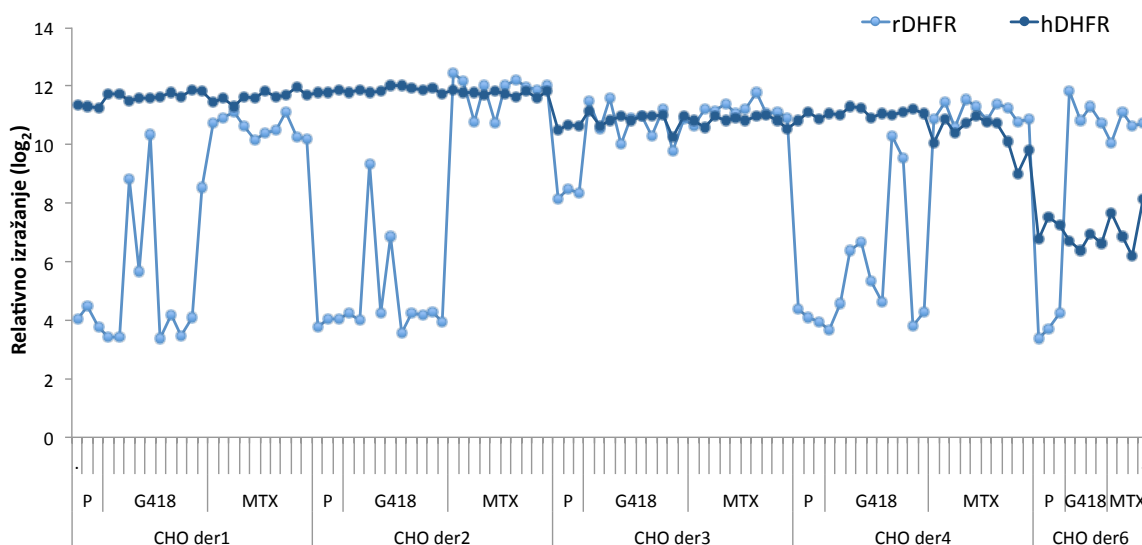
Original results obtained by GSEA. Gene groups were considered to be significantly enriched and were filtered according to the nominal P-value < 0.05 and $FDR < 0.05$. The number in front of the name of the function represents GO (Gene Ontology) identity number.

Znižano izražanje pri celični liniji CHO der6 – preostale cel. linije		
Celična komponenta	Molekularna funkcija	Biološki proces
0000775 chromosome, centromeric region	0004003 ATP-dependent DNA helicase activity	0006260 DNA replication
0000777 condensed chromosome kinetochore	0030295 protein kinase activator activity	0007126 meiosis
0000922 spindle pole	0003697 single-stranded DNA binding	0051301 cell division
0005681 spliceosomal complex	0008093 cytoskeletal adaptor activity	0030902 hindbrain development
0042555 MCM complex	0003743 translation initiation factor activity	0007067 mitosis
0000793 condensed chromosome		0006270 DNA replication initiation
		0007076 mitotic chromosome condensation
0000781 chromosome, telomeric region		0006281 DNA repair
0016607 nuclear speck		0008380 RNA splicing
0000794 condensed nuclear chromosome		0006402 mRNA catabolic process
0000776 kinetochore		0006310 DNA recombination
0005814 centriole		
0000784 nuclear chromosome, telomeric region		0051276 chromosome organization
		0048706 embryonic skeletal system development
		0009952 anterior/posterior pattern specification
		0043406 positive regulation of MAP kinase activity
		0006413 translational initiation
		0000398 mRNA splicing, via spliceosome
		0031572 G2/M transition DNA damage checkpoint
		0006397 mRNA processing
		0006406 mRNA export from nucleus
		0051298 centrosome duplication
		0000077 DNA damage checkpoint
		0051225 spindle assembly
		0010165 response to X-ray
		0006974 response to DNA damage stimulus

4.5.1.4.2 Analiza izražanja *rDHFR* in *hDHFR*

Z mikromrežami smo analizirali tudi izražanje *rDHFR*, ki smo ga v celice vnesli z ekspresijskim vektorjem in endogenega *hDHFR*. Izražanje obeh genov za vse 103 vzorce je prikazano na sliki 23. Seta sond za gen *Neo*, ki je poleg gena *rDHFR* drugi selekcijski

gen na ekspresijskem vektorju in omogoča poleg selekcije z MTX tudi selekcijo z G418 na mikromrežah, ni prisotnega.



Slika 23: Primerjava relativnega izražanja genov *rDHFR* in *hDHFR*

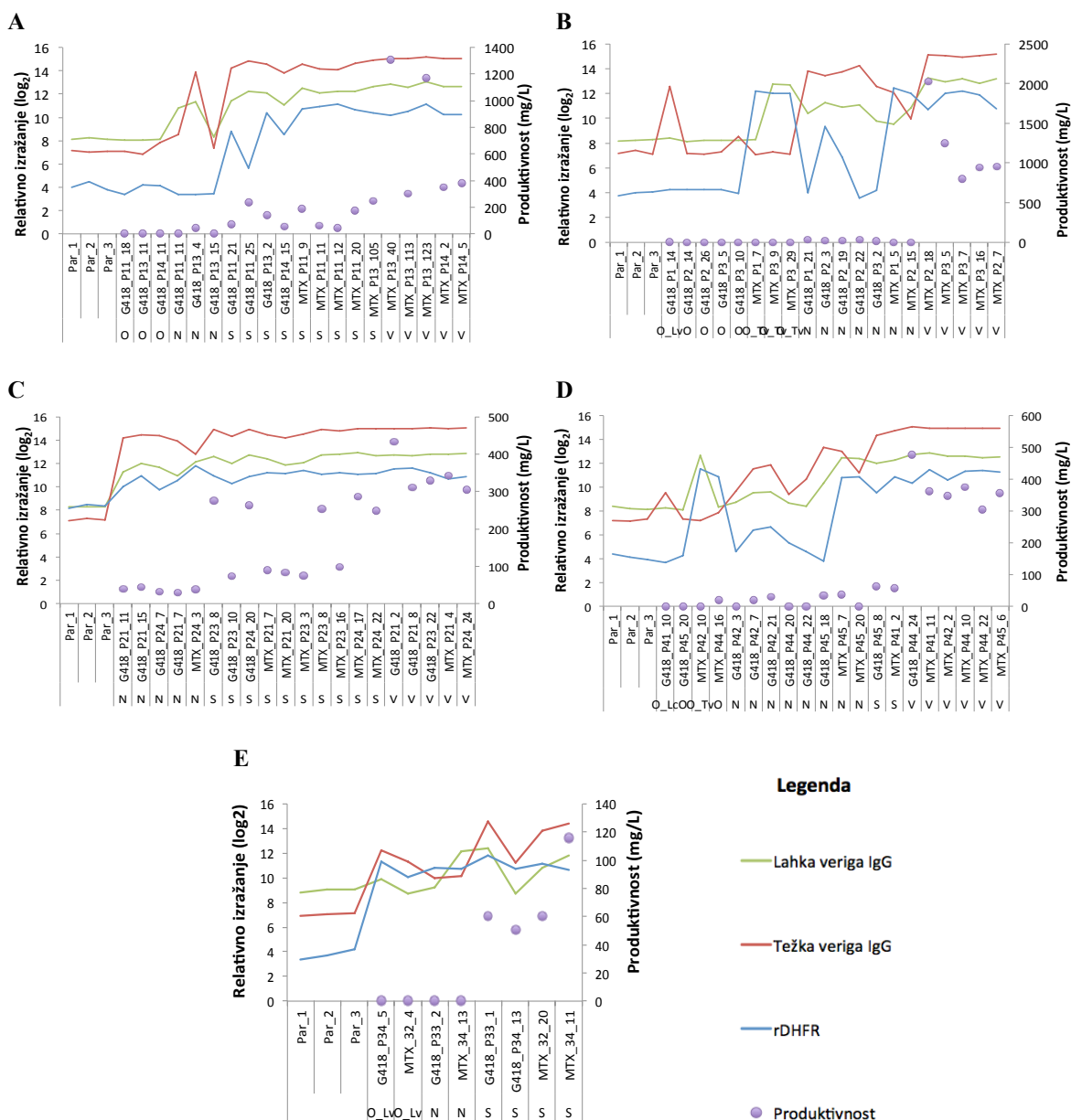
Prikazane so relativne $\log_2$ normalizirane vrednosti, pridobljene z mikromrežami. Oznake: P = starševske celične linije, G418 = klone selekcionirani z G418, MTX = klone selekcionirani z G418 in MTX.

Figure 23: Comparison of recombinant *DHFR* (*rDHFR*) and hamster *DHFR* (*hDHFR*) relative gene expression

Shown are relative $\log_2$ normalised values obtained with microarrays. Legend: P = parental cell lines, G418 = clones selected using G418, MTX = clones selected using G418 and MTX.

Hrčkov *DHFR* ima najvišje izražanje pri celičnih linijah CHO der1 in der2, sledita CHO der3 in der4, medtem ko ima CHO der6 izražanje na ravni ozadja. Rekombinantni *DHFR* ima variabilno izražanje pri G418 klonih pri celičnih linijah CHO der1, der2 in der4, medtem ko ima pri celičnih linijah CHO der3 in der6 konstantno povišano izražanje. Izražanje *rDHFR* pri MTX klonih (po selekciji z G418 in MTX) je za vse celične linije povišano.

Bolj podrobno izražanje gena *rDHFR* posamezno po celičnih linijah ter v povezavi z izražanjem gena za lahko in težko verigo in tudi produktivnostjo je prikazano na sliki 24.



Slika 24: Relativno izražanje genov za lahko in težko verigo IgG ter *rDHFR*, pridobljeno z mikromrežami za posamezne celične linije

Prikazane so $\log_2$ normalizirane vrednosti izražanja genov. (A) CHO der1, (B) CHO der2, (C) CHO der3, (D) CHO der4 in (E) CHO der6. Prikazane so tudi produktivnosti za posamezne klone. Oznake: Par1-3 = biološke ponovitve starševskih celičnih linij, O = kloni z manjkajočima ali okvarjenima Lv in Tv, O_Lv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Lv, O_Tv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Tv, N = nizko producirajoči kloni, S = srednje producirajoči kloni, V = visoko producirajoči kloni.

Figure 24: Relative microarray expression for light and heavy chain of IgG genes and *rDHFR* gene in each analysed CHO cell line

Shown are $\log_2$ normalised expression values. (A) CHO der1, (B) CHO der2, (C) CHO der3, (D) CHO der4 and (E) CHO der6. Also shown are productivity values for all clones. Legend: Par1-3 = biological replicates of parental cell lines, O = clones with a defective or missing light and heavy chain, O_Lv = clones with a defective or missing light chain, O_Tv clones with a defective or missing heavy chain, N = low producing clones, S = medium producing clones, V = high producing clones.

4.5.1.4.3 Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah

Pri primerjavi G418 klonov z MTX klonov (po selekciji z G418 in MTX) za vse celične linije hkrati smo z upoštevanjem pogojev $\log_2FC(\text{abs}) > 1$ (logaritmirana razlika v izražanju; angl. fold change – FC) ter vrednost $p \leq 0,05$ filtrirali gene, ki so zbrani v preglednici 33. Primerjali smo 44 G418 klonov in 44 MTX klonov iz vseh petih celičnih linij CHO.

Preglednica 33: Različno izraženi geni pri primerjavi gojenja z G418 (G418 kloni) in kombinacijo G418 in MTX (MTX kloni) za vse celične linije hkrati

Za mejo statistične značilnosti smo upoštevali naslednje pogoje: zvišano izražanje, $\log_2FC > 1$ in znižano izražanje, $\log_2FC < -1$; vrednost $p \leq 0,05$

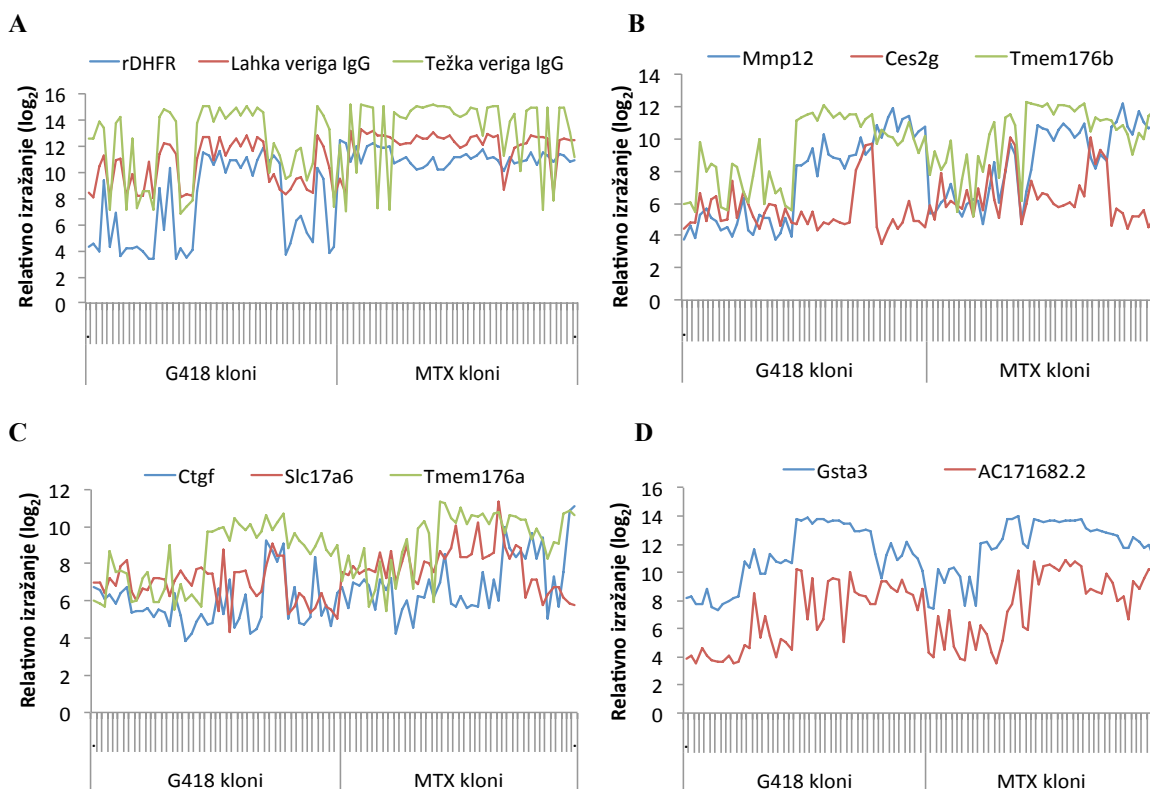
Table 33: Differentially expressed genes in comparison of different selection pressures - G418 only vs G418 and MTX

The following rules of statistical significance were used: $\log_2FC > 1$ (up-regulated genes) and $\log_2FC < -1$ (down-regulated genes); P-value ≤ 0.05 .

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>rDHFR</i>	-4,47	5,21E-16
gen za Lv IgG	-1,92	4,46E-09
gen za Tv IgG	-1,72	2,02E-03
<i>Mmp12</i>	-1,51	2,48E-03
<i>Ces2g</i>	-1,28	2,32E-05
<i>Tmem176b</i>	-1,26	1,40E-03
<i>Ctgf</i>	-1,20	1,72E-05
<i>Slc17a6</i>	-1,11	4,75E-07
<i>Tmem176a</i>	-1,10	6,13E-04
<i>Gsta3</i>	-1,04	1,03E-02
<i>AC171682.2</i>	-1,04	2,99E-02

Identificirali smo le gene, ki imajo znižano izražanje pri G418 klonih oz. zvišano pri MTX klonih (preglednica 33). Gen *rDHFR* ima pri G418 klonih izrazito znižano izražanje oz. ima pri MTX klonih (po selekciji z G418 in MTX) izrazito povišano izražanje. Razlog za to je v tem, da je MTX inhibitor encima DHFR in da se celice CHO ubranijo tako, da zvišajo izražanje gena za ta encim. Ker je zapis za *rDHFR* na ekspresijskem vektorju v neposredni bližini zapisa za lahko in težko verigo, se posledično zviša tudi njuno izražanje.

Dejanska izražanja genov iz preglednice 33 so prikazana na sliki 25.



Slika 25: Relativno izražanje izbranih genov iz primerjave vpliva tipa selekcijskega pritiska G418 oziroma MTX za vse celične linije hkrati

Prikazane so $\log_2$ normalizirane vrednosti. Za lažji pregled je izražanje prikazano za tri oz. dva gena hkrati: (A) *rDHFR*, gen za težko verigo IgG, gen za lahko verigo IgG, (B) *Mmp12*, *Ces2g*, *Tmem176b*, (C) *Ctgf*, *Slc17a6*, *Tmem176a*, (D) *Gsta3* in *Ac171682.2*.

Figure 25: Microarray expression for selected genes from the G418 vs MTX clones comparison

Shown are $\log_2$ normalised values. For a more transparent view three genes are shown on one graph: (A) *rDHFR*, heavy chain gene of IgG (Težka veriga IgG), light chain gene of IgG (Lahka veriga IgG), (B) *Mmp12*, *Ces2g*, *Tmem176b*, (C) *Ctgf*, *Slc17a6*, *Tmem176a*, (D) *Gsta3* and *Ac171682.2*.

Dodatno smo primerjali G418 klone z MTX kloni znotraj posamezne celične linije. Primerjali smo 10 MTX klonov z 10 G418 kloni pri celičnih linijah CHO der1 – CHO der4, ter 4 MTX klone s 4 G418 kloni pri celični liniji CHO der6. Z upoštevanjem enakih pogojev pri primerjavi selekcijskih stopenj za vse celične linije hkrati smo za posamezne celične linije filtrirali gene, ki so zbrani v preglednicah od 34 do 38.

Preglednica 34: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der1

Razlika v izražanju ($\log_2FC$) je prikazana glede na gojenje v prisotnosti G418. Poleg oznake gena in vrednosti $\log_2FC$ je prikazana še vrednost p.

Table 34: List of differentially expressed genes in the comparison of different selection pressures - G418 only vs combined G418 and MTX for CHO der1 cell line

Difference in expression ($\log_2FC$) is shown for clones cultured in the presence of G418. In addition to gene symbols (oznaka gena) and $\log_2FC$ the table also shows P-values (vrednost p).

Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost	Oznaka gena	$\log_2F$	Vrednost	Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost
<i>Col6a2</i>	2,98	5,11E-07	<i>Ankrd26</i>	1,09	6,43E-04	<i>Pde2a</i>	-1,45	3,36E-02
<i>Pde1a</i>	2,60	4,19E-04	<i>Rnf139</i>	1,07	1,91E-03	<i>AC166990.3</i>	-1,43	1,80E-02
<i>Nts</i>	2,52	5,48E-03	<i>Rrad</i>	1,05	1,57E-03	<i>GA036486.1</i>	-1,43	7,75E-03
<i>EZ733654.1</i>	2,46	1,92E-02	<i>Igf1bp7</i>	1,02	4,66E-02	<i>AC165080.4</i>	-1,42	2,04E-04
<i>FT012330.1</i>	2,39	7,01E-03	<i>FM130703.1</i>	1,02	8,39E-04	<i>AC122854.4</i>	-1,42	1,25E-02
<i>CS390845.1</i>	2,26	2,85E-02	<i>AC142256.4</i>	1,01	3,22E-02	<i>DD010735.1</i>	-1,41	2,86E-02
<i>Arsg</i>	2,20	2,15E-02	<i>Vps13c</i>	1,01	6,19E-04	<i>EZ733148.1</i>	-1,41	2,24E-02
<i>Fxyd1</i>	2,10	7,36E-04	<i>Dusp6</i>	1,00	1,48E-03	<i>Aim1</i>	-1,39	8,84E-05
<i>CS394287.1</i>	2,10	9,17E-03	<i>I500015O10Rik</i>	1,00	9,39E-04	<i>Il1r1l</i>	-1,34	1,89E-02
<i>Klh1l</i>	1,92	1,53E-03	<i>AZ325376.1</i>	1,00	1,80E-03	<i>CS391352.1</i>	-1,33	3,91E-02
<i>Mtap7d2</i>	1,87	2,11E-03	<i>rDHFR</i>	-5,07	1,94E-04	<i>Cdh13</i>	-1,33	4,58E-02
<i>AC121832.3</i>	1,81	3,95E-03	gen za Tv IgG	-3,89	7,46E-03	<i>Tinag</i>	-1,32	3,61E-03
<i>AC108837.9</i>	1,73	1,70E-03	<i>Oat</i>	-3,60	4,64E-03	<i>AC008163.4</i>	-1,31	2,90E-03
<i>GH536603.1</i>	1,68	4,12E-02	<i>Tmem176b</i>	-3,19	1,08E-03	<i>CT573046.17</i>	-1,30	4,23E-02
<i>Deptor</i>	1,66	3,71E-04	<i>AL844838.7</i>	-3,18	3,79E-03	<i>AK037650</i>	-1,29	4,12E-02
<i>AK142976</i>	1,65	1,19E-02	<i>CS390958.1</i>	-2,72	4,15E-02	<i>Sprr1a</i>	-1,27	2,04E-03
<i>FT175107.1</i>	1,62	1,03E-02	<i>GR592450.1</i>	-2,66	1,40E-02	<i>Cubn</i>	-1,26	2,04E-02
<i>CS390933.1</i>	1,54	2,64E-03	<i>Tmem176a</i>	-2,55	2,52E-03	<i>CS390989.1</i>	-1,23	9,12E-07
<i>Thra</i>	1,51	4,26E-03	<i>Mmp12</i>	-2,53	1,00E-03	<i>Prss22</i>	-1,21	1,01E-02
<i>Susd1</i>	1,49	1,98E-02	<i>AJ297131.1</i>	-2,49	1,41E-02	<i>Trem14</i>	-1,20	1,06E-02
<i>CS397619.1</i>	1,47	2,53E-02	gen za Lv IgG	-2,40	2,09E-03	<i>Sfrs18</i>	-1,17	1,96E-03
<i>Mtss1</i>	1,46	3,72E-04	<i>Asxl2</i>	-2,29	5,90E-03	<i>Nnmt</i>	-1,17	4,23E-03
<i>Hdac9</i>	1,45	3,99E-02	<i>Ugt1a6a</i>	-2,27	5,82E-03	<i>Pirt</i>	-1,17	1,25E-02
<i>Pre1p</i>	1,44	1,23E-02	<i>Ctla2a</i>	-2,26	3,00E-04	<i>GA089562.1</i>	-1,17	1,19E-02
<i>DQ235090.1</i>	1,42	8,40E-05	<i>FI846974.1</i>	-2,25	5,68E-03	<i>AC158589.7</i>	-1,16	9,65E-03
<i>Thbs1</i>	1,41	1,70E-03	<i>Hoxa9</i>	-2,15	2,19E-02	<i>Trib3</i>	-1,16	1,27E-06
<i>AC140486.4</i>	1,41	5,83E-03	<i>Ctla2b</i>	-2,09	2,54E-04	<i>GH541371.1</i>	-1,11	8,87E-04
<i>Col8a1</i>	1,40	1,55E-02	<i>Sirt5</i>	-2,03	3,86E-02	<i>Ctgf</i>	-1,11	2,92E-02
<i>CS397554.1</i>	1,38	8,71E-03	<i>AC124993.19</i>	-2,02	5,95E-03	<i>Bcl2a1d</i>	-1,10	4,37E-03
<i>Aldh1a1</i>	1,35	3,36E-02	<i>Cgnl1</i>	-1,99	5,16E-03	<i>Serpinf1</i>	-1,10	9,11E-04
<i>Igdcc4</i>	1,34	2,19E-02	<i>AC107786.14</i>	-1,94	6,89E-03	<i>AC119840.12</i>	-1,09	2,27E-02
<i>AK047158</i>	1,31	1,06E-03	<i>Ccbe1</i>	-1,91	1,52E-02	<i>CS393990.1</i>	-1,09	3,62E-02
<i>Hivep3</i>	1,30	1,28E-03	<i>Gsta3</i>	-1,87	7,85E-05	<i>AC124517.4</i>	-1,08	5,96E-03
<i>Plekha6</i>	1,30	1,63E-02	<i>Fgf18</i>	-1,82	2,61E-02	<i>BC021614</i>	-1,07	6,72E-03
<i>Gpr153</i>	1,25	2,55E-03	<i>Ldhc</i>	-1,77	7,49E-03	<i>Dusp1</i>	-1,07	3,55E-03
<i>Mmp14</i>	1,22	3,76E-04	<i>BZ141870.1</i>	-1,76	1,86E-02	<i>Tcfap2a</i>	-1,06	2,74E-03
<i>GH542750.1</i>	1,21	1,21E-03	<i>Dtx3l</i>	-1,75	1,38E-02	<i>Pla1a</i>	-1,06	8,83E-03
<i>AC125171.4</i>	1,21	1,80E-03	<i>DD431786.1</i>	-1,74	1,22E-02	<i>CR169934.1</i>	-1,05	7,45E-03
<i>AL593843.9</i>	1,20	3,82E-03	<i>Cntn1</i>	-1,71	1,04E-02	<i>Sprr2k</i>	-1,05	4,26E-02
<i>Ch1l</i>	1,20	2,61E-04	<i>Ifi203</i>	-1,71	1,62E-02	<i>4933425L06Rik</i>	-1,05	2,86E-02
<i>Gldc</i>	1,19	8,63E-03	<i>Atf5</i>	-1,70	4,73E-06	<i>Prnp</i>	-1,05	1,42E-02
<i>Phf201l</i>	1,18	2,10E-03	<i>Matn4</i>	-1,65	9,30E-05	<i>Nupr1</i>	-1,04	7,36E-03
<i>Med24</i>	1,18	3,85E-03	<i>Ces2g</i>	-1,64	2,53E-02	<i>Cd53</i>	-1,04	1,17E-02
<i>Spry2</i>	1,17	3,64E-04	<i>Cited1</i>	-1,61	6,23E-03	<i>Il1f9</i>	-1,03	7,00E-03
<i>Trio</i>	1,17	3,28E-06	<i>Doxl2</i>	-1,61	3,07E-02	<i>GH467467.1</i>	-1,03	4,68E-02
<i>CS390785.1</i>	1,17	1,63E-02	<i>Ifi44</i>	-1,56	4,08E-03	<i>CU459186.17</i>	-1,02	2,01E-04
<i>Lmo7</i>	1,16	1,71E-02	<i>Stc2</i>	-1,52	7,87E-04	<i>Gfra2</i>	-1,02	2,80E-02
<i>CS393262.1</i>	1,14	8,02E-03	<i>AC127545.4</i>	-1,52	1,48E-02	<i>Pard6b</i>	-1,02	5,11E-04
<i>Adam19</i>	1,13	2,86E-03	<i>AJ650362.1</i>	-1,50	4,79E-02	<i>Syt16</i>	-1,01	3,50E-02
<i>GH541626.1</i>	1,13	5,22E-03	<i>Dad1</i>	-1,49	2,33E-02	<i>Fmo2</i>	-1,01	2,91E-04
<i>Pcdh7</i>	1,11	4,54E-04	<i>BX842664.2</i>	-1,49	4,68E-02	<i>AA140572.1</i>	-1,01	4,32E-02
<i>AC112142.4</i>	1,11	1,46E-04	<i>Asns</i>	-1,48	1,48E-06	<i>Rap1gap2</i>	-1,00	2,50E-03
<i>CS396620.1</i>	1,11	1,02E-03	<i>Krt14</i>	-1,47	1,93E-02			
<i>Tbl1xr1</i>	1,11	5,43E-03	<i>AC121137.18</i>	-1,46	1,83E-02			

Preglednica 35: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der2

Razlika v izražanju ($\log_2FC$) je prikazana glede na gojenje v prisotnosti G418. Poleg oznake gena in vrednosti $\log_2FC$ je prikazana še vrednost p.

Table 35: List of differentially expressed genes in the comparison of different selection pressures - G418 only vs combined G418 and MTX for CHO der2 cell line

Difference in expression ($\log_2FC$) is shown for clones cultured in the presence of G418. In addition to gene symbols (oznaka gena) and $\log_2FC$ the table also shows P-values (vrednost p).

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>Egr1</i>	1,24	2,01E-02
<i>Clqmf1</i>	1,07	2,10E-02
<i>Cxcl3</i>	-1,05	3,36E-02
<i>Ncln</i>	-1,06	8,58E-04
<i>Cxcl1</i>	-1,13	9,49E-06
<i>AC171682.2</i>	-1,17	2,05E-02
<i>Gm13318</i>	-1,17	6,77E-03
<i>Jakmip2</i>	-1,27	4,98E-02
<i>EU660217.1</i>	-1,28	8,38E-04
<i>Mmp12</i>	-1,33	9,24E-05
<i>DD010735.1</i>	-1,81	4,91E-02
gen za Lv IgG	-2,60	1,61E-03
<i>rDHFR</i>	-6,97	1,62E-08

Preglednica 36: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der3

Razlika v izražanju ($\log_2FC$) je prikazana glede na gojenje v prisotnosti G418. Poleg oznake gena in vrednosti $\log_2FC$ je prikazana še vrednost p.

Table 36: List of differentially expressed genes in the comparison of different selection pressures - G418 only vs combined G418 and MTX for CHO der3 cell line

Difference in expression ($\log_2FC$) is shown for clones cultured in the presence of G418. In addition to gene symbols (oznaka gena) and $\log_2FC$ the table also shows P-values (vrednost p).

Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost	Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost	Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost
<i>AC125171.4</i>	1,24	2,00E-04	<i>AL592149.8</i>	-1,61	3,58E-09	<i>Ereg</i>	-1,13	9,23E-04
<i>Ugt1a6a</i>	1,73	4,36E-02	<i>DH943475.1</i>	-1,59	2,56E-03	<i>Ctla2a</i>	-1,13	5,12E-05
<i>AK047158</i>	1,24	1,10E-04	<i>Lcp1</i>	-1,58	1,68E-04	<i>NG_005612.1</i>	-1,13	1,01E-02
<i>Gm11669</i>	1,29	1,40E-03	<i>Glpr1</i>	-1,58	1,06E-05	<i>Oas1l</i>	-1,13	6,36E-05
<i>AZ987648.1</i>	1,21	3,04E-03	<i>Slc4a10</i>	-1,55	1,55E-06	<i>AC134528.6</i>	-1,13	1,24E-02
<i>CU207324.10</i>	1,04	7,24E-05	<i>AL669926.6</i>	-1,52	1,52E-05	<i>Nppa</i>	-1,13	2,00E-03
<i>DQ235090.1</i>	1,12	3,36E-06	<i>Sema4d</i>	-1,50	3,44E-05	<i>GH514219.1</i>	-1,13	2,96E-04
<i>Tlm</i>	1,02	8,90E-04	<i>Dsp</i>	-1,49	3,53E-03	<i>Plaur</i>	-1,12	3,85E-05
<i>BZ141870.1</i>	1,12	8,44E-04	<i>AC156552.10</i>	-1,47	8,67E-06	<i>Tmprss11f</i>	-1,12	2,96E-03
<i>CS397572.1</i>	1,13	2,15E-04	<i>GH538305.1</i>	-1,44	1,83E-03	<i>B2BF95_RAT</i>	-1,12	3,30E-06
<i>AC114551.12</i>	1,14	1,95E-05	<i>Ecm1</i>	-1,44	4,30E-06	<i>Slc14a1</i>	-1,12	2,16E-03
<i>EU204642.1</i>	1,12	3,01E-08	<i>AC158560.4</i>	-1,43	7,32E-03	<i>Mmp10</i>	-1,12	3,05E-05
<i>GA023863.1</i>	1,08	8,91E-04	<i>NA</i>	-1,43	2,13E-03	<i>Tprg</i>	-1,10	4,05E-03
<i>AC119840.12</i>	1,07	8,17E-06	<i>Ldlrad3</i>	-1,43	2,70E-05	<i>CT025612.11</i>	-1,10	3,72E-04
<i>D29972.1</i>	1,23	3,91E-06	<i>CU367883.10</i>	-1,41	4,53E-06	<i>AC107798.10</i>	-1,10	1,50E-03
<i>Cdh9</i>	1,03	1,60E-04	<i>Gm12185</i>	-1,40	1,09E-02	<i>AC147986.3</i>	-1,10	6,14E-05
<i>CS396810.1</i>	1,00	4,09E-04	<i>AL831781.8</i>	-1,39	6,16E-05	<i>EU660217.1</i>	-1,10	6,41E-04
<i>Lrig1</i>	1,02	8,25E-05	<i>AL844161.18</i>	-1,38	7,08E-04	<i>Ptgs2</i>	-1,09	1,84E-06
<i>Col3a1</i>	1,22	3,35E-02	<i>Gm11342</i>	-1,38	6,08E-05	<i>Usp18</i>	-1,09	5,88E-05
<i>Ptx3</i>	1,27	1,82E-03	<i>Ces2g</i>	-1,37	4,58E-07	<i>Gjb5</i>	-1,09	1,82E-03
<i>Ccdc80</i>	1,07	6,29E-05	<i>Egr2</i>	-1,37	4,81E-07	<i>Ahnak</i>	-1,09	4,43E-03
<i>FG731489.1</i>	1,49	1,03E-02	<i>AC098839.3</i>	-1,36	9,46E-04	<i>Sp100</i>	-1,09	3,83E-04
<i>6330406115Ri</i>	1,23	1,20E-02	<i>Trp53inp1</i>	-1,36	1,26E-04	<i>I700048O20R</i>	-1,08	3,62E-04
<i>Cd53</i>	-3,25	6,99E-07	<i>Procr</i>	-1,35	3,89E-02	<i>Odc1</i>	-1,08	9,23E-05
<i>Il33</i>	-2,51	1,67E-03	<i>Nr5a2</i>	-1,35	5,71E-05	<i>Fth</i>	-1,08	2,31E-03
<i>Sulf2</i>	-2,46	7,51E-04	<i>Nupr1</i>	-1,34	1,63E-06	<i>AL672026.11</i>	-1,07	1,78E-02
<i>4930486L24R</i>	-2,39	3,37E-04	<i>Adh1</i>	-1,33	5,39E-04	<i>Ly6g6c</i>	-1,07	1,37E-05
<i>Slc17a6</i>	-2,21	2,90E-04	<i>4930455F23R</i>	-1,32	6,78E-05	<i>Plcl2</i>	-1,07	2,27E-04
<i>Map3k5</i>	-2,18	1,80E-06	<i>Il17f</i>	-1,31	7,38E-06	<i>Fst</i>	-1,06	3,67E-02
<i>Aldh1a1</i>	-2,11	6,63E-05	<i>Aox1</i>	-1,30	3,56E-05	<i>BC021614</i>	-1,05	1,49E-03
<i>GH484812.1</i>	-2,04	9,45E-07	<i>Isg20</i>	-1,30	4,51E-07	<i>Hmox1</i>	-1,05	3,12E-06
<i>S100a4</i>	-2,04	1,24E-07	<i>Man2a2</i>	-1,30	1,61E-05	<i>Gm13318</i>	-1,05	1,15E-03
<i>NM_008350.4</i>	-2,04	7,13E-05	<i>CU459186.17</i>	-1,28	1,56E-08	<i>Dhx34</i>	-1,05	3,10E-03
<i>Asb4</i>	-2,00	1,22E-03	<i>AC135289.3</i>	-1,28	1,15E-02	<i>Ly96</i>	-1,04	2,15E-06
<i>Lipg</i>	-2,00	5,24E-08	<i>Vnn1</i>	-1,28	1,39E-06	<i>CK221450.1</i>	-1,04	3,04E-04
<i>Spp1</i>	-1,96	1,52E-03	<i>Ccdc135</i>	-1,27	8,56E-05	<i>Anxa8</i>	-1,04	4,75E-04
<i>3830417A13R</i>	-1,95	3,39E-03	<i>Cited1</i>	-1,24	1,99E-04	<i>Olfml2b</i>	-1,04	7,94E-04
<i>AC171682.2</i>	-1,94	7,48E-03	<i>Cd38</i>	-1,24	9,80E-04	<i>Fam78b</i>	-1,03	1,49E-05
<i>Adcy7</i>	-1,89	1,78E-03	<i>Cd68</i>	-1,23	2,47E-03	<i>Inhbb</i>	-1,03	2,79E-03
<i>Sh3gl2</i>	-1,86	6,61E-05	<i>Clec4f</i>	-1,22	8,54E-05	<i>GH462824.1</i>	-1,03	4,10E-06
<i>GH541371.1</i>	-1,84	5,69E-05	<i>AL603707.5</i>	-1,22	8,73E-04	<i>HA782113.1</i>	-1,02	2,60E-02
<i>Mylk</i>	-1,83	6,75E-09	<i>AC115917.11</i>	-1,21	2,00E-08	<i>Trib1</i>	-1,02	5,30E-06
<i>DH602215.1</i>	-1,80	1,79E-02	<i>DM209471.1</i>	-1,20	3,89E-05	<i>Bin2</i>	-1,02	5,13E-07
<i>Nppb</i>	-1,80	5,84E-04	<i>Map4kl</i>	-1,20	1,06E-02	<i>AC087102.3</i>	-1,01	1,77E-04
<i>Mmp12</i>	-1,77	1,21E-06	<i>Tigit</i>	-1,19	4,82E-05	<i>Hist1h2bc</i>	-1,01	1,03E-07
<i>Gsta1</i>	-1,76	5,59E-05	<i>Areg</i>	-1,18	1,79E-05	<i>Aim1</i>	-1,01	1,67E-04
<i>Ifi203</i>	-1,74	2,08E-06	<i>Tnfrsf9</i>	-1,18	2,26E-05	<i>Lamp2</i>	-1,01	4,24E-05
<i>Isg15</i>	-1,69	4,91E-07	<i>GH495311.1</i>	-1,17	1,86E-05	<i>AC115067.7</i>	-1,01	1,34E-02
<i>AC129609.1</i>	-1,67	3,79E-05	<i>Slc40a1</i>	-1,16	4,47E-04	<i>Slpi</i>	-1,01	8,43E-05
<i>Bcl2a1d</i>	-1,62	5,58E-05	<i>GH511736.1</i>	-1,15	6,94E-04	<i>Hsd11b1</i>	-1,00	4,14E-02
<i>AC153080.4</i>	-1,61	1,84E-04	<i>Pla1a</i>	-1,15	3,13E-06			

Preglednica 37: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der4

Razlika v izražanju ($\log_2FC$) je prikazana glede na gojenje v prisotnosti G418. Poleg oznake gena in vrednosti $\log_2FC$ je prikazana še vrednost p.

Table 37: List of differentially expressed genes in the comparison of different selection pressures - G418 only vs combined G418 and MTX for CHO der4 cell line

Difference in expression ($\log_2FC$) is shown for clones cultured in the presence of G418. In addition to gene symbols (oznaka gena) and $\log_2FC$ the table also shows P-values (vrednost p).

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost
<i>AC118772.5</i>	1,15	5,81E-04	<i>Cttna2</i>	-1,21	6,50E-04
<i>4632434111R</i>	1,11	4,99E-05	<i>Gsta3</i>	-1,20	5,84E-03
<i>AC129323.6</i>	1,09	2,68E-03	<i>AC121854.2</i>	-1,19	3,68E-05
<i>Tsix</i>	1,09	3,69E-04	<i>Gm13318</i>	-1,11	8,44E-04
<i>F3</i>	1,02	1,47E-03	<i>AC127247.3</i>	-1,08	7,18E-03
<i>GH541371.1</i>	-1,23	4,13E-02	<i>Ifi44</i>	-1,07	4,47E-03
<i>rDHFR</i>	-5,23	5,54E-05	<i>Vwa5a</i>	-1,07	2,52E-03
gen za Lv	-2,93	1,49E-03	<i>GH520063.</i>	-1,06	1,87E-03
<i>CU024886.5</i>	-1,84	1,12E-03	<i>AC110682.6</i>	-1,06	1,27E-02
<i>Ctgf</i>	-1,75	2,79E-03	<i>XM_002166</i>	-1,05	2,03E-03
<i>Il19</i>	-1,27	2,76E-02	<i>Klhl4</i>	-1,04	1,17E-02
<i>AC163670.3</i>	-1,27	2,02E-04	<i>Trp53inp1</i>	-1,03	3,22E-03
<i>Ypel3</i>	-1,27	4,86E-05	<i>GH509703.</i>	-1,01	3,41E-03
<i>Wdr63</i>	-1,23	4,68E-04	<i>Slc27a6</i>	-1,01	3,54E-02
<i>Mdh1b</i>	-1,22	1,87E-02	<i>Casp1</i>	-1,01	7,12E-03
<i>CT025612.11</i>	-1,21	5,19E-03			

Preglednica 38: Seznam genov s statistično različnim izražanjem pri gojenju z G418 ali kombinacijo G418 in MTX celične linije CHO der6

Razlika v izražanju ($\log_2FC$) je prikazana glede na gojenje v prisotnosti G418. Poleg oznake gena in vrednosti $\log_2FC$ je prikazana še vrednost p.

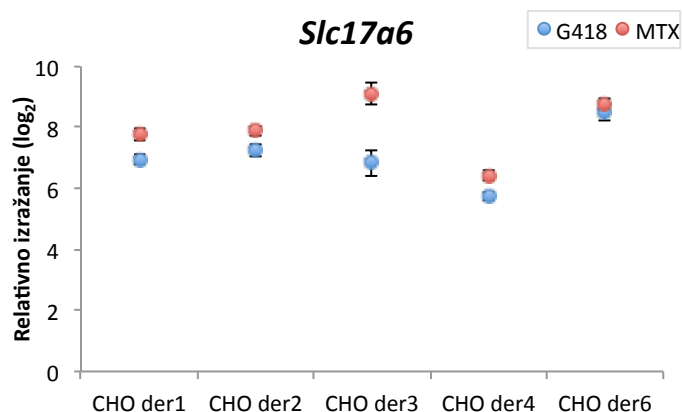
Table 38: List of differentially expressed genes in the comparison of different selection pressures - G418 only vs combined G418 and MTX for CHO der6 cell line

Difference in expression ($\log_2FC$) is shown for clones cultured in the presence of G418. In addition to gene symbols (oznaka gena) and $\log_2FC$ the table also shows P-values (vrednost p).

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>AC125171.4</i>	1,21	4,96E-03
<i>AC141481.4</i>	1,16	4,23E-02
<i>NG_005612.1</i>	1,14	1,81E-02

Izmed vseh genov, zbranih v preglednicah od 33 do 38, smo za nadaljnje potrjevanje rezultatov, dobljenih z mikromrežami z metodo qPCR, izbrali gen *Slc17a6*. Zanj smo se odločili, ker ima povišano izražanje pri MTX klonih (po selekciji z G418 in MTX) pri večini celičnih linij (preglednica 33).

Izražanje pridobljeno z mikromrežami za izbrani gen, je prikazano na sliki 25C, povprečno izražanje za posamezne celične linije pa na sliki 26.

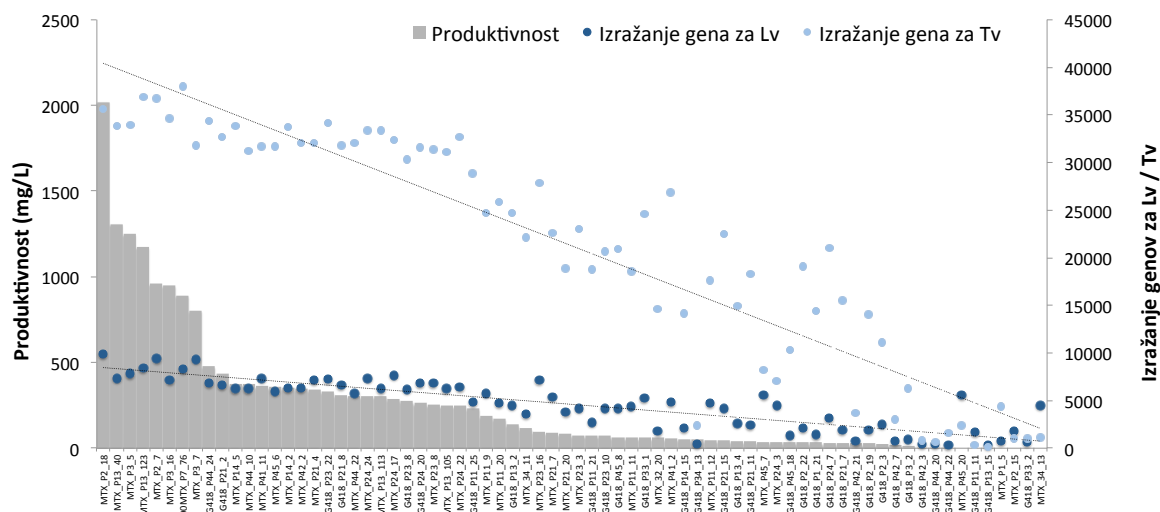


Slika 26: Primerjava relativnega izražanja gena *Slc17a6* pri gojenju celic z MTX ali brez njega. Prikazane so log₂ normalizirane vrednosti, pridobljene z mikromrežami, in območje standardne napake. Z modro so prikazane povprečne vrednosti izražanja genov pri G418 klonih, z rdečo pa povprečne vrednosti izražanja genov pri klonih, selekcioniranih z G418 in MTX znotraj posamezne celične linije.

Figure 26: Comparison of *Slc17a6* relative gene expression in cells cultivated with or without MTX. Shown are log₂ normalised values obtained with micorarrays. The blue circles represent mean expression values for G418 clones and the red circles represent mean expression values for the clones selected with G418 and MTX for each CHO cell line. Error bars represent standard error.

4.5.1.4.4 Analiza vpliva jakosti produkcije na transkriptom celičnih linij

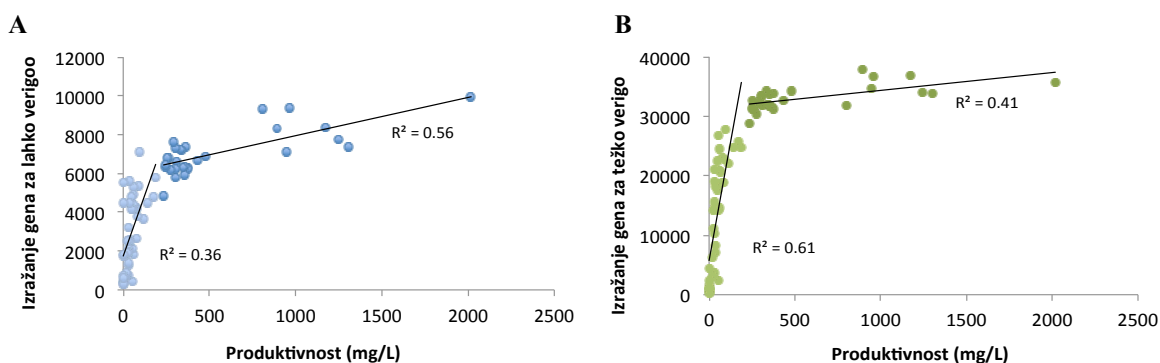
Kot uvod v analizo transkriptoma so na sliki 27 prikazani odvisnost izražanja genov za lahko in težko verige mAb in produktivnost za nizko, srednje in visoko producirajoče klonе (brez klonov z manjkajočim ali okvarjenim genom za lahko in/ali težko verigo mAb). Dodatno je na sliki 28 prikazana tudi korelacija med produktivnostjo in izražanjem transgenov oz. genov za lahko in težko verigo.



Slika 27: Izražanje genov za lahko (Lv) in težko (Tv) verigo IgG ter prikaz produktivnosti za posamezne klone

Izražanje genov je pridobljeno z mikromrežami. Rezultati so prikazani za 72 producirajočih klonov.

Figure 27: Expression of light- and heavy chain IgG genes and productivity results for each analysed clone
Expression values were obtained with microarrays. Results are shown for 72 producing clones.



Slika 28: Korelacija med produktivnostjo in izražanjem gena za lahko verigo (A) oz. težko verigo (B) IgG
Izražanje genov je pridobljeno z mikromrežami. Rezultati so prikazani za 72 producirajočih klonov z intaktnim genom za lahko oz. težko verigo IgG. Svetlo modra/svetlo zelena barva predstavlja klone s produktivnostjo pod 100 mg/L, temno modra/temno zelena barva predstavlja klone s produktivnostjo nad 100 mg/L.

Figure 28: Correlation between productivity and expression of light chain- (A) or heavy chain (B) of IgG gene

Expression values were obtained with microarrays. Results are shown for 72 producing clones that contain an intact gene for the light or heavy chain of IgG. Light blue/light green represents clones with productivity below 100 mg/L, dark blue/dark green represents clones with productivity above 100 mg/L.

Pri primerjavi visoko producirajočih klonov (V) z nizko producirajočimi kloni (N) za vse celične linije hkrati smo z upoštevanjem pogojev $\log_2FC(ABS) > 1$ ter vrednost $p \leq 0,05$ filtrirali gene, ki so zbrani v preglednici 39. Primerjali smo 22 visoko producirajočih klonov in 25 nizko producirajočih klonov.

Preglednica 39: Različno izraženi geni pri primerjavi visoko producirajočih klonov z nizko producirajočimi kloni za vse celične linije hkrati v analizi z mikromrežami

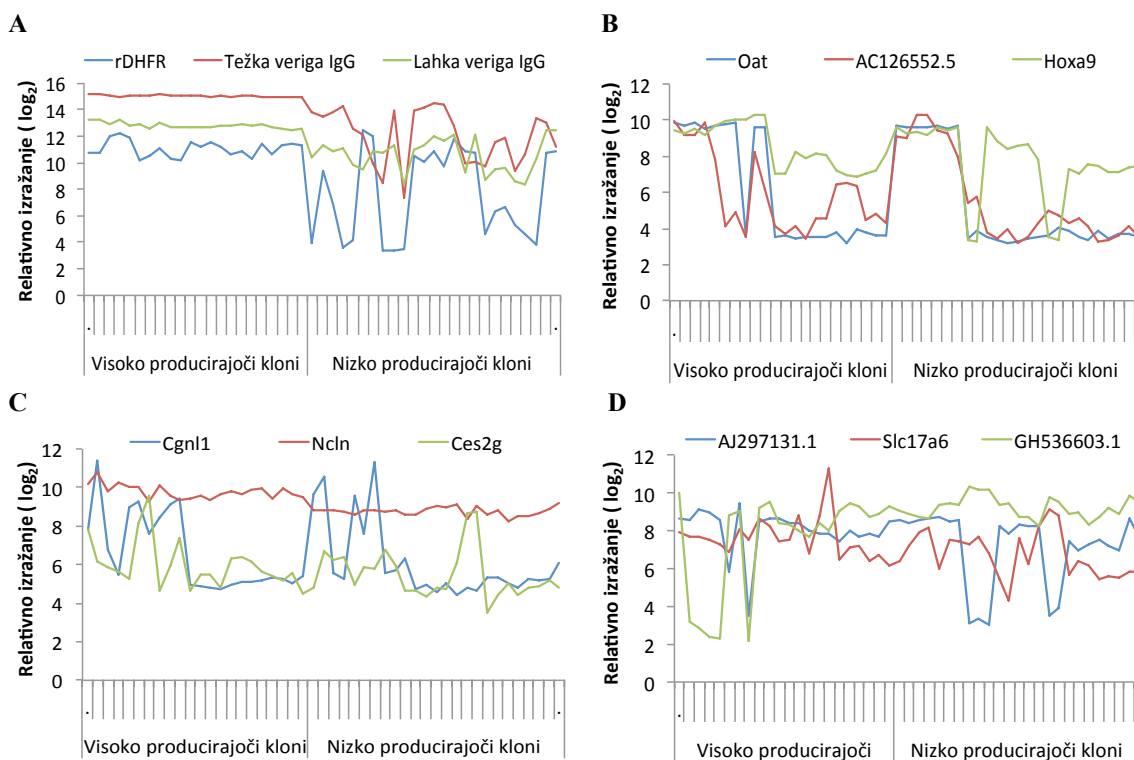
Za mejo statistične značilnosti smo upoštevali naslednje pogoje: zvišano izražanje, $\log_2FC > 1$ in znižano izražanje, $\log_2FC < -1$ ter vrednost $p \leq 0,05$. S sivo so označeni geni, ki imajo zvišano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 33).

Table 39: Differentially expressed genes in the comparison of high- vs low producing clones based on microarray analysis

The following rules of statistical significance were used: $\log_2FC > 1$ (up-regulated genes) and $\log_2FC < -1$ (down-regulated genes); P-value ≤ 0.05 . Genes marked with grey are up-regulated also in MTX clones (see table 33).

Oznaka gena	$\log_2F$	Vrednost p
<i>rDHFR</i>	3,97	9,079E-09
gen za Tv IgG	3,05	7,016E-15
gen za Lv IgG	2,31	7,101E-16
<i>Oat</i>	1,75	2,868E-02
<i>AC126552.5</i>	1,32	4,104E-02
<i>Hoxa9</i>	1,19	1,974E-02
<i>Cgnl1</i>	1,16	3,367E-02
<i>Ncln</i>	1,11	5,716E-21
<i>Ces2g</i>	1,10	1,273E-02
<i>AJ297131.1</i>	1,09	3,574E-02
<i>Slc17a6</i>	1,04	9,048E-04
<i>GH536603.1</i>	-1,27	8,737E-03

Izražanje za gene, zbrane v preglednici 39 je prikazano na sliki 29.



Slika 29: Relativno izražanje 12 genov, identificiranih kot diferencialno izraženih v primerjavi visoko producirajočih klonov z nizko producirajočimi kloni za vse celične linije hkrati

Prikazane so $\log_2$ normalizirane vrednosti pridobljene z mikromrežami. Za lažji pregled je izražanje prikazano za tri gene hkrati: (A) *rDHFR*, gen za težko verigo IgG, gen za lahko verigo IgG, (B) *Oat*, *AC126552.5*, *Hoxa9*, (C) *Cngl1*, *Ncln*, *Ces2g*, (D) *AJ297131.1*, *Slc17a6* in *GH536603.1*.

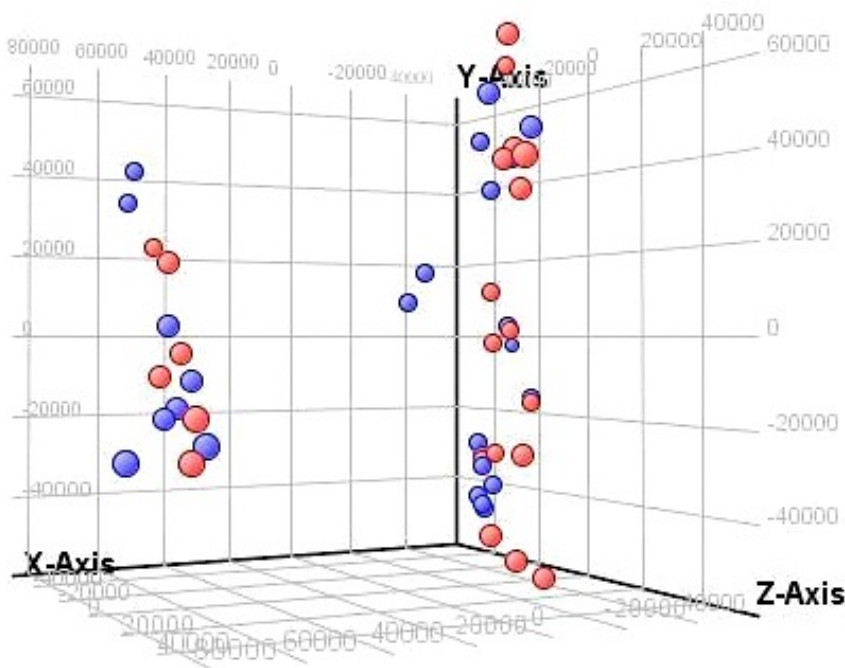
Figure 29: Relative expression for 12 genes in the comparison of high- vs low producing clones

Shown are $\log_2$ normalised values obtained with microarrays. For a more transparent view three genes are shown on one graph: (A) *rDHFR*, heavy chain gene of IgG (Težka veriga IgG), light chain gene of IgG (Lahka veriga IgG), (B) *Oat*, *AC126552.5*, *Hoxa9*, (C) *Cngl1*, *Ncln*, *Ces2g*, (D) *AJ297131.1*, *Slc17a6* and *GH536603.1*.

Rezultati izražanja za gen *rDHFR*, genov za težko in lahko verigo IgG (transgena) so bili pričakovani. Dodatno smo opazili, da so vsi trije geni enakomerno zvišano izraženi pri visokih producentih, medtem ko pri nizkih producentih vrednosti nihajo. Pri večini nizko producirajočih klonih nihanja za vse tri omenjene gene sovpadajo. V analizi je med najbolj zanimivimi gen *Ncln* (slika 29C) z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih in z znižanim izražanjem pri nizko producirajočih klonih. V obeh skupinah klonov so vrednosti izražanja enakomerno zvišane/znižane ne glede na celično linijo CHO. Pri vseh preostalih genih (*Oat*, *AC126552.5*, *Hoxa9*, *Cngl1*, *Ces2g*, *AJ297131.1*, *Slc17a6* in *GH536603.1*) je izražanje znotraj skupine visoko/nizko producirajočih klonov zelo variabilno.

Glede na analizo PCA transkriptoma visoko in nizko producirajočih klonov (slika 30) se kloni ne razvrstijo v dve ločeni skupini glede na produktivnost, temveč so kvečjemu še vedno vidne skupine glede na izvor starševske celične linije. Zadnji rezultati so skladni z

analizo PCA vseh vzorcev (slika 18). Kot že omenjeno, obe analizi PCA nakazujeta bistvene razlike v ekspresijskih profilih med posameznimi celičnimi linijami CHO. Zaradi tega, in tudi zaradi majhnega števila različno izraženih genov v primerjavi visoko producirajočih klonov (V) z nizko producirajočimi kloni (N) za vse celične linije hkrati, smo izvedli dodatne analize. Primerjali smo visoko producirajoče klone (V) z nizko producirajočimi kloni (N) znotraj posamezne celične linije.



Slika 30: Analiza glavnih komponent (PCA) visoko in nizko producirajočih klonov
Rdeča barva predstavlja visoko producirajoče klone, modra pa nizko producirajoče klone.
Figure 30: Principal component analysis (PCA) of high vs low producing clones
The red colour represents high producing clones and the blue low producing clones.

V primerjavi visoko producirajočih klonov (V) z nizko producirajočimi kloni (N) znotraj posamezne celične linije smo s pogoji $\log_2FC(abc) > 1$, FC – fold change ter vrednost $p \leq 0,05$ filtrirali večje število genov, ki so za posamezno celično linijo zbrani v preglednicah od 40 do 45. Število različno izraženih genov pri posamezni celični liniji je znašalo:

- pri CHO der1: 326 genov (113 z zvišanim in 213 z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih),
- pri CHO der2: 26 genov (22 z zvišanim in 4 z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih),
- pri CHO der3: 167 genov (84 z zvišanim in 83 z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih),
- pri CHO der4: 30 genov (25 z zvišanim in 5 z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih).

Iz analize smo izključili najnižje producirajočo celično linijo CHO der6, saj visokih producentov ni bilo, in tudi zaradi nizkega števila vzorcev.

Ker visoko in nizko producirajoči kloni izvirajo iz selekcij z G418 in MTX, smo, da bi se izognili izboru genov, na katere bi lahko vplivala G418 ali MTX, označili tiste, ki se pojavijo v obeh analizah (v primerjavi G418 in MTX klonov in tudi v primerjavi visoko in nizko producirajočih klonov). Geni, ki se pojavijo kot značilno izraženi v obeh primerjavah, so lahko genetski označevalci za produktivnost ali na njihovo zvišano/znižano izražanje vpliva MTX.

Preglednica 40: Seznam genov z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der1

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti $\log_2FC$ in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo znižano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 34). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize s qPCR.

Table 40: List of significantly up-regulated genes in high producing clones from the CHO der1 cell line
Shown are gene symbols (oznaka gena), $\log_2FC$ and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are up-regulated also in MTX clones (table 34). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>rDHFR</i>	7.03	4.17E-07	<i>GA08956</i>	1.92	8.88E-04	<i>Nnmt</i>	1.26	4.31E-02
<i>CS390958.1</i>	5.29	5.01E-03	<i>Dner</i>	1.90	5.01E-03	<i>Stc2</i>	1.24	4.41E-02
gen za Tv IgG	5.16	2.01E-05	<i>Tinag</i>	1.89	5.04E-03	<i>AK081960</i>	1.23	1.64E-02
<i>Oat</i>	4.88	1.44E-02	<i>Gsta3</i>	1.88	1.83E-02	<i>AC115880.11</i>	1.22	2.27E-02
<i>Hoxa9</i>	4.70	2.40E-04	<i>Cubn</i>	1.87	3.53E-02	<i>D930028M14</i>	1.22	1.11E-05
<i>AL844838.7</i>	4.40	9.70E-03	<i>AC15858</i>	1.86	6.93E-03	<i>Ptpdc1</i>	1.22	4.33E-03
<i>AJ297131.1</i>	4.05	2.12E-03	<i>Prnp</i>	1.83	2.08E-03	<i>AL845340.11</i>	1.21	3.17E-02
<i>Sirt5</i>	3.88	4.45E-03	<i>AC11984</i>	1.80	1.67E-02	<i>CR169934.1</i>	1.20	3.20E-02
<i>GR592450.1</i>	3.75	2.56E-02	<i>AC14132</i>	1.78	1.81E-02	<i>Nfil3</i>	1.18	1.46E-03
<i>Tmem176b</i>	3.34	3.08E-02	<i>AC12285</i>	1.76	4.34E-02	<i>CS390989.1</i>	1.18	1.24E-02
<i>Tmem176a</i>	3.21	1.30E-02	<i>Asns</i>	1.76	8.77E-04	<i>DY317844.1</i>	1.18	3.65E-02
<i>F1846974.1</i>	3.17	1.52E-02	<i>Atf5</i>	1.70	6.81E-03	<i>Grkl</i>	1.18	6.74E-04
<i>Cntn1</i>	3.07	1.71E-03	<i>AC00816</i>	1.69	1.49E-02	<i>Cnksr1</i>	1.18	1.36E-03
<i>Ctla2a</i>	3.04	8.15E-04	<i>Svt16</i>	1.64	1.75E-02	<i>Fgd3</i>	1.17	1.46E-03
<i>Cgnl1</i>	2.94	3.58E-03	<i>Sfrs18</i>	1.63	2.69E-02	<i>Tcfap2a</i>	1.16	3.51E-02
<i>DD431786.1</i>	2.81	4.14E-03	<i>Glra2</i>	1.61	1.15E-02	<i>Ippk</i>	1.16	1.84E-04
<i>BZ141870.1</i>	2.71	1.75E-02	<i>Slc38a4</i>	1.61	2.63E-02	<i>AC153080.4</i>	1.15	1.05E-02
<i>Ctla2b</i>	2.67	2.25E-03	<i>Mtus1</i>	1.55	1.63E-02	<i>AL592149.8</i>	1.15	4.76E-03
<i>Ldhc</i>	2.63	1.71E-02	<i>AC12451</i>	1.54	2.23E-03	<i>AC140209.2</i>	1.13	3.24E-02
gen za Lv IgG	2.60	4.23E-05	<i>Nupr1</i>	1.54	1.51E-02	<i>Sat1</i>	1.11	2.09E-04
<i>AC107786.14</i>	2.59	2.19E-02	<i>Pirt</i>	1.53	1.16E-02	<i>Grin2d</i>	1.11	1.80E-04
<i>Krt14</i>	2.37	2.58E-03	<i>Sprrr2h</i>	1.53	1.01E-02	<i>Dsp</i>	1.10	2.12E-02
<i>GA036486.1</i>	2.32	5.51E-04	<i>Prss22</i>	1.52	4.39E-02	<i>A730037C10R</i>	1.10	1.02E-02
<i>Dad1</i>	2.32	1.20E-02	<i>GH54182</i>	1.49	1.34E-02	<i>Mx2</i>	1.10	5.11E-03
<i>Dtx3l</i>	2.31	4.61E-02	<i>Trem14</i>	1.46	3.89E-02	<i>Retsat</i>	1.09	3.61E-02
<i>AC124993.19</i>	2.29	4.31E-02	<i>AC11535</i>	1.45	2.86E-02	<i>Dock10</i>	1.09	4.25E-02
<i>AK037650</i>	2.28	3.16E-03	<i>Cd53</i>	1.43	1.96E-02	<i>Akr1b8</i>	1.08	4.81E-04
<i>Ctgf</i>	2.14	8.45E-04	<i>Tmem56</i>	1.39	2.64E-03	<i>Trib3</i>	1.08	1.58E-02
<i>EZ733148.1</i>	2.12	3.77E-02	<i>Serpinf1</i>	1.38	7.44E-03	<i>AL606525.7</i>	1.06	4.60E-02
<i>AC166990.3</i>	2.12	1.05E-02	<i>Aim1</i>	1.37	2.57E-02	<i>AC154610.3</i>	1.05	1.89E-02
<i>Main4</i>	2.11	2.26E-04	<i>Mesdc1</i>	1.37	1.52E-03	<i>AC158554.6</i>	1.05	1.19E-02
<i>AC165080.4</i>	2.11	1.10E-04	<i>Tnfaip6</i>	1.36	1.20E-02	<i>AC122357.4</i>	1.05	8.02E-03
<i>DD010735.1</i>	2.07	3.12E-02	<i>CU45918</i>	1.30	1.66E-03	<i>Sep3</i>	1.05	4.43E-04
<i>Doxl2</i>	2.06	4.93E-02	<i>Pard6b</i>	1.30	2.03E-03	<i>Slc6a9</i>	1.04	4.43E-03
<i>Sprrr1a</i>	2.04	6.09E-04	<i>Iigp1</i>	1.30	2.67E-02	<i>AC125353.2</i>	1.04	3.76E-02
<i>Cited1</i>	2.02	3.36E-02	<i>AY180177</i>	1.30	8.02E-03	<i>Fem1a</i>	1.03	4.95E-02
<i>AC127545.4</i>	2.02	4.58E-02	<i>AC10212</i>	1.29	6.48E-03	<i>Gfod1</i>	1.01	1.89E-02
<i>Sprrr2k</i>	1.99	9.54E-03	<i>Bcl2a1d</i>	1.27	3.39E-02			

Preglednica 41: Seznam genov z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der1

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti $\log_2FC$ in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo znižano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 34). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize s qPCR.

Table 41: List of significantly down-regulated genes in high producing clones from the CHO der1 cell line. Shown are gene symbols (oznaka gena), $\log_2FC$ and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are down-regulated also in MTX clones (table 34). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka	$\log_2$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>Arsge</i>	-4,36	1,09E-03	<i>FM130703.1</i>	-1,51	2,79E-03	<i>AL583850.5</i>	-1,17	1,44E-02
<i>EZ733654.1</i>	-4,23	6,45E-03	<i>Thsd7a</i>	-1,49	6,74E-05	<i>B230120H23</i>	-1,17	3,87E-04
<i>FT012330.1</i>	-3,84	4,27E-03	<i>Epor</i>	-1,49	1,27E-02	<i>Rgs10</i>	-1,16	6,03E-03
<i>CS390845.1</i>	-3,68	1,39E-02	<i>Acta2</i>	-1,49	2,22E-02	<i>Icam1</i>	-1,16	1,06E-04
<i>BC024814</i>	-3,64	1,09E-02	<i>H2-DMa</i>	-1,46	1,23E-02	<i>AC153828.8</i>	-1,15	1,18E-04
<i>Col6a2</i>	-3,48	6,19E-04	<i>CS396620.1</i>	-1,46	6,10E-03	<i>Tagln</i>	-1,15	1,90E-03
<i>Fxyd1</i>	-3,30	1,45E-04	<i>Galnt7</i>	-1,45	2,84E-06	<i>AC152395.9</i>	-1,15	3,23E-02
<i>CS394287.1</i>	-3,29	6,81E-03	<i>Prol1</i>	-1,44	2,32E-05	<i>Aldh3b1</i>	-1,14	1,63E-03
<i>Nts</i>	-3,26	8,69E-03	<i>CS396224.1</i>	-1,44	5,84E-05	<i>Ccdc80</i>	-1,14	7,61E-03
<i>AC139673.9</i>	-3,13	3,39E-02	<i>AB078421.1</i>	-1,43	4,35E-04	<i>Tmeff2</i>	-1,14	7,53E-03
<i>Vcam1</i>	-2,84	1,25E-02	<i>Kif2a</i>	-1,43	4,83E-04	<i>4831426119Ri</i>	-1,14	4,28E-05
<i>AC116325.5</i>	-2,83	4,39E-02	<i>Phf201l</i>	-1,43	2,02E-02	<i>4833442J19R</i>	-1,14	3,47E-02
<i>Col8a1</i>	-2,78	3,89E-04	<i>Smarca1</i>	-1,42	2,63E-05	<i>Cwf19l2</i>	-1,14	9,04E-05
<i>Pde1a</i>	-2,75	2,50E-02	<i>Thbs1</i>	-1,42	3,73E-02	<i>Tatdn1</i>	-1,13	1,12E-02
<i>Mt1p</i>	-2,72	2,01E-02	<i>Fam102b</i>	-1,40	6,74E-06	<i>Cep290</i>	-1,13	2,13E-05
<i>AK142976</i>	-2,62	1,19E-02	<i>Myk</i>	-1,39	6,03E-03	<i>Sgce</i>	-1,12	4,94E-03
<i>Deptor</i>	-2,54	6,42E-04	<i>Cybrd1</i>	-1,39	6,19E-06	<i>CT030635.8</i>	-1,12	2,32E-03
<i>GH536603.1</i>	-2,47	4,92E-02	<i>Glde</i>	-1,37	2,81E-02	<i>Wnt5b</i>	-1,11	2,12E-03
<i>Igdcc4</i>	-2,46	6,01E-03	<i>Ccnd1</i>	-1,37	7,62E-04	<i>GH512276.1</i>	-1,11	2,63E-02
<i>Ncam1</i>	-2,38	4,71E-02	<i>Ormdl3</i>	-1,37	1,62E-02	<i>Kif21a</i>	-1,11	9,11E-04
<i>Thra</i>	-2,37	1,78E-03	<i>Wbp11</i>	-1,36	1,53E-04	<i>Sobp</i>	-1,11	3,68E-03
<i>CS397619.1</i>	-2,37	3,05E-02	<i>Col5a2</i>	-1,35	1,11E-02	<i>Rsrc2</i>	-1,11	1,23E-04
<i>AC121832.3</i>	-2,27	2,76E-02	<i>Nfix</i>	-1,35	1,59E-05	<i>Ankrd12</i>	-1,10	1,17E-04
<i>CS390933.1</i>	-2,27	5,20E-03	<i>AL671935.30</i>	-1,35	1,51E-02	<i>Pde7a</i>	-1,10	7,53E-04
<i>Aldh1a1</i>	-2,26	3,10E-02	<i>Rnf139</i>	-1,35	1,29E-02	<i>EU660217.1</i>	-1,10	1,79E-02
<i>Klhl1</i>	-2,25	6,66E-03	<i>Trio</i>	-1,35	1,56E-03	<i>EU204642.1</i>	-1,09	4,49E-03
<i>AC108837.9</i>	-2,24	9,23E-03	<i>GH505296.1</i>	-1,34	1,92E-02	<i>Kdelc1</i>	-1,08	5,51E-04
<i>AK047158</i>	-2,23	1,28E-04	<i>AC139885.3</i>	-1,33	1,24E-03	<i>1500015O10</i>	-1,08	1,07E-02
<i>CS397554.1</i>	-2,19	1,03E-02	<i>4933421E11R</i>	-1,33	4,86E-05	<i>Cenpe</i>	-1,08	6,45E-05
<i>FT175107.1</i>	-2,17	2,83E-02	<i>Tlm</i>	-1,33	3,83E-03	<i>Ankrd32</i>	-1,08	6,04E-03
<i>Id2</i>	-2,14	3,46E-02	<i>Ptpm</i>	-1,32	3,56E-02	<i>Gpatch2</i>	-1,08	1,73E-03
<i>Plekha6</i>	-2,10	1,10E-02	<i>Ehd3</i>	-1,32	4,48E-03	<i>Ubr5</i>	-1,07	2,64E-03
<i>Prep</i>	-2,09	1,01E-02	<i>AC129212.4</i>	-1,32	8,16E-05	<i>Notch3</i>	-1,07	1,78E-03
<i>Mt1p7d2</i>	-2,08	2,52E-02	<i>Ubc</i>	-1,32	1,08E-02	<i>Eml4</i>	-1,07	5,16E-04
<i>AC163670.3</i>	-2,01	1,62E-02	<i>Pcdhga11</i>	-1,31	2,07E-02	<i>AC137950.16</i>	-1,07	4,22E-02
<i>AL593843.9</i>	-2,01	1,43E-03	<i>Sorbs2</i>	-1,29	6,73E-04	<i>4922501C03</i>	-1,07	2,84E-03
<i>Gpr153</i>	-1,97	6,69E-04	<i>Sqle</i>	-1,29	2,43E-03	<i>AC153985.4</i>	-1,07	6,97E-04
<i>AC125171.4</i>	-1,97	7,61E-04	<i>Ubt1</i>	-1,29	6,23E-05	<i>Cacna2d1</i>	-1,07	3,21E-04
<i>Susd1</i>	-1,94	3,38E-02	<i>Smap</i>	-1,29	1,76E-04	<i>Folh1</i>	-1,07	8,80E-03
<i>AC140486.4</i>	-1,91	1,70E-02	<i>FR016431.1</i>	-1,29	7,58E-03	<i>4933411K20</i>	-1,06	1,36E-04
<i>Gsdma3</i>	-1,88	1,05E-02	<i>1700040I03Ri</i>	-1,29	2,68E-03	<i>Fstl1</i>	-1,06	2,55E-03
<i>Mmp14</i>	-1,88	5,13E-05	<i>Psm3</i>	-1,27	1,72E-02	<i>Prkca</i>	-1,06	1,21E-04
<i>Chl1</i>	-1,84	1,25E-04	<i>Pik3ip1</i>	-1,27	2,64E-03	<i>Suds3</i>	-1,05	1,62E-02
<i>Angptl4</i>	-1,82	4,34E-03	<i>F7</i>	-1,27	5,01E-03	<i>AL831718.6</i>	-1,05	3,59E-02
<i>EF470604.1</i>	-1,82	3,03E-02	<i>1700020I14Ri</i>	-1,27	6,08E-04	<i>Wwc2</i>	-1,05	6,55E-04
<i>Nr1h5</i>	-1,81	2,20E-02	<i>AZ733076.1</i>	-1,27	2,60E-04	<i>Bhlhe40</i>	-1,05	1,21E-02
<i>GH541626.1</i>	-1,80	1,59E-03	<i>Fam179b</i>	-1,26	1,86E-04	<i>Smek2</i>	-1,05	2,16E-03
<i>CS390785.1</i>	-1,78	2,00E-02	<i>Klhl11</i>	-1,26	2,10E-04	<i>Son</i>	-1,05	2,72E-04
<i>Adam19</i>	-1,78	8,38E-04	<i>Aktip</i>	-1,25	1,79E-03	<i>AL591146.21</i>	-1,04	3,87E-02
<i>Slc2a9</i>	-1,78	9,75E-04	<i>Cul2</i>	-1,25	9,23E-04	<i>Dusp6</i>	-1,04	2,84E-02
<i>Hivep3</i>	-1,78	3,77E-03	<i>Ehbp1</i>	-1,24	3,48E-05	<i>CS396638.1</i>	-1,04	1,62E-02
<i>AC114551.12</i>	-1,75	6,17E-03	<i>AC107764.11</i>	-1,24	6,44E-03	<i>Emk1</i>	-1,03	1,43E-04
<i>DQ235090.1</i>	-1,74	3,61E-03	<i>1700081L11R</i>	-1,24	5,56E-03	<i>Rps6kb1</i>	-1,03	3,09E-03
<i>Ankrd26</i>	-1,72	4,72E-05	<i>Spry2</i>	-1,23	1,95E-02	<i>AC163211.5</i>	-1,03	8,36E-03
<i>AC141481.4</i>	-1,72	2,44E-04	<i>AB370295.1</i>	-1,23	8,50E-04	<i>Dopey1</i>	-1,03	4,92E-03
<i>Pcdh7</i>	-1,71	3,33E-04	<i>AJ403638.1</i>	-1,23	7,68E-05	<i>Eeal</i>	-1,03	8,99E-04
<i>1700023A16R</i>	-1,68	1,32E-02	<i>Braf</i>	-1,23	6,13E-06	<i>Rin2</i>	-1,03	3,20E-04
<i>AZ325376.1</i>	-1,67	7,25E-04	<i>AC112142.4</i>	-1,22	4,48E-03	<i>AC121116.7</i>	-1,03	3,41E-04

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 41: Seznam genov z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der1

Oznaka	log ₂	Vrednost p	Oznaka	log ₂ F	Vrednost p	Oznaka	log ₂ FC	Vrednost p
<i>Olfml2b</i>	-1,67	1,27E-02	<i>BF467189</i>	-1,21	2,33E-04	<i>Usp15</i>	-1,03	9,24E-03
<i>Tbl1xr1</i>	-1,67	3,35E-03	<i>Ddhd2</i>	-1,21	4,70E-03	<i>Atp11b</i>	-1,02	1,36E-03
<i>GH542750.1</i>	-1,67	3,85E-03	<i>Fbxo32</i>	-1,21	1,10E-02	<i>Cldn15</i>	-1,02	8,36E-03
<i>Med24</i>	-1,62	1,03E-02	<i>Wdfy4</i>	-1,21	3,70E-02	<i>Slc27a3</i>	-1,02	2,22E-02
<i>1700013F07R</i>	-1,60	2,70E-02	<i>E430025E2</i>	-1,21	2,07E-02	<i>Daam1</i>	-1,02	4,67E-03
<i>Ptx3</i>	-1,59	1,60E-02	<i>Sort1</i>	-1,20	1,82E-06	<i>Rbm19</i>	-1,02	1,70E-04
<i>Scn2a1</i>	-1,58	6,62E-05	<i>Snhg11</i>	-1,20	8,84E-04	<i>Nfib</i>	-1,01	6,94E-03
<i>Vps13c</i>	-1,58	1,52E-04	<i>Trove2</i>	-1,20	4,35E-04	<i>Svil</i>	-1,01	2,80E-02
<i>Mtss1</i>	-1,57	1,98E-02	<i>Arf2</i>	-1,19	3,51E-02	<i>Med1</i>	-1,00	1,01E-02
<i>Thrap3</i>	-1,57	8,18E-05	<i>Zhx1</i>	-1,19	2,29E-02	<i>C1qtnf2</i>	-1,00	2,67E-02
<i>Nsf</i>	-1,56	3,80E-04	<i>Fkbp10</i>	-1,19	6,29E-04	<i>Clu</i>	-1,00	1,34E-02
<i>FM100369.1</i>	-1,55	4,18E-03	<i>Atrx</i>	-1,18	1,16E-03	<i>Arid4b</i>	-1,00	1,72E-03
<i>AC154464.2</i>	-1,53	3,50E-03	<i>Uvrax</i>	-1,17	1,38E-04	<i>Ccdc77</i>	-1,00	2,19E-04

Preglednica 42: Seznam genov z zvišanim in znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der2

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti log₂FC in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo zvišano/znižano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 35). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize s qPCR.

Table 42: List of significantly up- and down-regulated genes in high producing clones from the CHO der2 cell line

Shown are gene symbols (oznaka gena), log₂FC and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are up-/down- regulated also in MTX clones (table 35). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka gena	log ₂ FC	Vrednost p	Oznaka gena	log ₂ FC	Vrednost p
<i>rDHFR</i>	4,04	4,82E-04	<i>Anxa8</i>	1,27	4,80E-04
gen za Lv IgG	2,53	1,26E-13	<i>Cxcl1</i>	1,14	3,44E-07
gen za Tv IgG	2,23	7,08E-07	<i>CS397554.1</i>	1,13	4,38E-02
<i>Gsta3</i>	2,16	2,61E-05	<i>AC124600.5</i>	1,08	2,25E-05
<i>Gm11015</i>	2,14	2,05E-02	<i>Thbs2</i>	1,08	4,15E-03
<i>9230019H11Rik</i>	1,78	3,28E-03	<i>Myrip</i>	1,07	4,33E-02
<i>AC171682.2</i>	1,78	4,48E-03	<i>Hmgcs2</i>	1,02	4,47E-02
<i>FM122822.1</i>	1,78	2,89E-02	<i>Casp1</i>	1,01	4,92E-03
<i>EU660217.1</i>	1,65	2,49E-05	<i>Mmp12</i>	1,01	3,37E-03
<i>Pnliprp2</i>	1,44	2,39E-02	<i>Egr1</i>	-1,77	8,88E-03
<i>Ncln</i>	1,43	5,43E-12	<i>CS397619.1</i>	-1,15	3,22E-02
<i>AC142256.4</i>	1,39	9,73E-03	<i>CU207324.10</i>	-1,02	3,62E-02
<i>GH492107.1</i>	1,37	1,19E-05	<i>Dkk3</i>	-1,01	2,62E-09

Preglednica 43: Seznam genov z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der3

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti $\log_2FC$ in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo zvišano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 36). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize z qPCR.

Table 43: List of significantly up-regulated genes in high producing clones from the CHO der3 cell line
Shown are gene symbols (oznaka gena), $\log_2FC$ and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are up-regulated also in MTX clones (table 36). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka gena	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2F$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p
<i>Tceal5</i>	4,64	2,68E-04	<i>BT125482</i>	1,53	1,37E-03	<i>Heatr7b2</i>	1,16	6,43E-04
<i>Id2</i>	4,23	1,20E-06	<i>Micalcl</i>	1,53	8,22E-06	<i>Nbl1</i>	1,15	6,52E-04
<i>AC171682.2</i>	3,03	8,99E-05	<i>AC135289</i>	1,53	2,18E-02	<i>GH501126.1</i>	1,15	4,78E-04
<i>Kbtbd7</i>	2,83	2,23E-03	<i>AC115067</i>	1,49	2,89E-03	<i>Ecm1</i>	1,15	1,91E-02
<i>Sulf2</i>	2,58	2,66E-03	<i>Ahnak</i>	1,49	7,67E-04	<i>Slc41a2</i>	1,13	2,34E-03
<i>Il33</i>	2,26	1,98E-02	<i>Lcp1</i>	1,43	1,59E-02	<i>Gm11179</i>	1,13	4,69E-04
<i>Adcy7</i>	2,24	8,18E-04	<i>GA036486</i>	1,43	4,48E-05	<i>Nr5a2</i>	1,12	7,34E-03
<i>Fst</i>	2,18	1,82E-05	<i>Cd68</i>	1,41	5,03E-03	<i>Rps6ka2</i>	1,10	2,37E-02
<i>GH538305.1</i>	2,12	2,22E-04	<i>Coro2b</i>	1,38	1,09E-05	<i>Smarchb1</i>	1,09	1,28E-02
<i>Slc17a6</i>	2,08	1,20E-02	<i>Rgs10</i>	1,37	2,03E-04	<i>Hivep3</i>	1,09	1,12E-03
<i>Gm12185</i>	1,99	2,17E-03	<i>GH529485</i>	1,35	2,61E-04	<i>Acyp1</i>	1,09	2,78E-05
<i>Farpl</i>	1,96	7,54E-03	<i>Cd38</i>	1,34	4,48E-03	<i>Syt16</i>	1,09	4,40E-05
<i>Dsp</i>	1,94	2,07E-04	<i>Runx2</i>	1,34	1,62E-07	<i>Ccbe1</i>	1,09	1,51E-02
<i>AC124993.19</i>	1,94	2,19E-07	<i>AC157938</i>	1,32	5,07E-03	<i>Epha2</i>	1,08	1,32E-04
<i>Tll</i>	1,92	7,61E-03	<i>Tmeff2</i>	1,32	1,86E-02	<i>Pde4b</i>	1,07	6,25E-03
<i>Atp10a</i>	1,86	2,50E-05	<i>AC109311</i>	1,31	1,36E-03	<i>Ldlrad3</i>	1,07	2,13E-02
<i>AY780303.1</i>	1,85	5,07E-04	<i>Sh3gl2</i>	1,31	4,65E-02	gen za Tv	1,07	5,43E-05
<i>Map4k1</i>	1,83	3,05E-04	<i>GH467467</i>	1,30	4,26E-04	<i>Elovl7</i>	1,07	8,69E-03
<i>BX537258.3</i>	1,82	1,57E-02	<i>Nat2</i>	1,30	1,41E-04	<i>Sema3e</i>	1,06	3,49E-03
<i>Aldh1a1</i>	1,76	1,08E-02	<i>Ndufab1</i>	1,26	7,25E-05	<i>2610203C20</i>	1,05	8,30E-03
<i>D3ZYZ1 RAT</i>	1,66	1,14E-03	<i>Slc14a1</i>	1,20	5,55E-03	<i>Hmga2</i>	1,03	3,48E-03
<i>NM_008350.4</i>	1,63	1,86E-02	<i>Col8a1</i>	1,20	3,62E-03	<i>AC124740.4</i>	1,03	4,80E-02
<i>AC158560.4</i>	1,62	1,77E-02	<i>AL603707</i>	1,20	1,01E-02	<i>Sorbs3</i>	1,03	2,42E-03
<i>Procr</i>	1,60	4,62E-02	<i>GA089562</i>	1,19	6,64E-04	<i>Tnfrsf9</i>	1,02	7,17E-03
<i>HA782113.1</i>	1,60	2,01E-03	<i>Fgfr2</i>	1,18	6,41E-03	<i>6530401G17</i>	1,02	4,21E-03
<i>Ncam1</i>	1,60	3,11E-04	<i>Gm11342</i>	1,17	1,66E-02	<i>Smox</i>	1,00	4,21E-03
<i>Nsun4</i>	1,57	1,42E-02	<i>AC107798</i>	1,17	1,39E-02	<i>Man2a2</i>	1,00	1,53E-02
<i>FT044557.1</i>	1,54	1,20E-03	gen za Lv	1,16	6,71E-06	<i>Anxa8</i>	1,00	1,31E-02

Preglednica 44: Seznam genov z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der3

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti $\log_2FC$ in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo znižano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 36). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize s qPCR.

Table 44: List of significantly down-regulated genes in high producing clones from the CHO der3 cell line. Shown are gene symbols (oznaka gena), $\log_2FC$ and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are down-regulated also in MTX clones (table 36). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p
4930422G04	-1,00	3,82E-06	CS397468.1	-1,16	1,90E-04	AC153514.8	-1,52	3,37E-02
CA506758.1	-1,01	8,93E-04	AC114420.11	-1,20	2,07E-04	Col3a1	-1,53	1,85E-02
Cds1	-1,02	1,86E-05	Chadl	-1,20	1,33E-05	DD010735.1	-1,54	2,17E-05
Zfp605	-1,03	1,31E-04	Rarres2	-1,22	8,18E-05	Angptl4	-1,58	6,48E-04
AC163343.2	-1,03	5,39E-03	Ptx3	-1,22	1,27E-02	CS393262.1	-1,58	8,93E-03
Wnk4	-1,03	2,49E-03	Clec3b	-1,23	5,18E-03	BX842664.2	-1,59	4,15E-03
Rap1gds1	-1,03	5,35E-06	Trem14	-1,24	1,22E-03	AK037650	-1,60	7,83E-03
CT573034.8	-1,04	3,71E-05	Gm16441	-1,25	8,07E-03	GH457871.1	-1,60	3,24E-04
CS391352.1	-1,04	6,75E-06	Nr1h5	-1,26	5,94E-06	Fn1	-1,62	1,09E-02
F3	-1,04	2,71E-03	Trpm7	-1,28	1,22E-02	DH943475.1	-1,62	2,34E-02
Epor	-1,04	8,41E-03	Ccne1	-1,29	3,71E-06	Fbn1	-1,67	1,16E-02
AP003151.1	-1,04	1,75E-04	C430049B03	-1,30	7,86E-05	Pla2g7	-1,67	3,99E-05
AC158392.2	-1,05	4,05E-05	AC103636.11	-1,30	5,66E-05	Cd36	-1,69	4,26E-02
CS396650.1	-1,05	9,55E-04	Fgf18	-1,31	2,94E-02	Dcn	-1,74	3,79E-03
Ccdc80	-1,06	1,89E-03	Zfp395	-1,31	2,46E-05	Zmat4	-1,86	6,71E-03
AC122769.1	-1,06	3,40E-04	Afap112	-1,32	1,72E-06	6330406115	-1,90	2,52E-04
Zfand2a	-1,06	3,36E-05	Col27a1	-1,33	5,19E-04	AC119947.1	-2,17	4,07E-07
AC144542.4	-1,07	8,91E-04	AC188539.6	-1,33	7,76E-03	Fam5c	-2,24	3,64E-05
4933425L06	-1,07	2,26E-02	AL596258.15	-1,34	1,47E-03	FG731489.1	-2,26	1,67E-04
FN376188.1	-1,07	1,23E-05	AC155717.4	-1,37	1,95E-03	AC138309.4	-2,48	9,96E-06
AC141328.4	-1,07	4,44E-06	Cacnb4	-1,38	3,47E-03	Ugt1a6a	-2,49	9,70E-03
H2-K1	-1,09	1,74E-07	Tlcl2	-1,41	1,72E-04	DQ235090.1	-2,57	1,98E-06
Lbh	-1,12	3,16E-05	AC111135.10	-1,43	1,77E-06	Gm14296	-2,66	5,14E-04
Fabp4	-1,13	6,02E-03	Col12a1	-1,44	1,06E-02	AA140572.1	-2,74	8,62E-03
Msl1	-1,16	1,02E-05	AL672026.11	-1,47	1,12E-02	AC124752.4	-2,80	1,23E-05
B1319477.1	-1,16	1,90E-02	CS396336.1	-1,49	3,18E-05	Cxcl12	-3,15	2,26E-04
Rgs16	-1,16	3,01E-04	Vgf	-1,50	1,44E-05	CT573046.1	-3,89	6,61E-05
AC154751.2	-1,16	9,34E-04	AL845317.7	-1,51	1,72E-04			

Preglednica 45: Seznam genov z zvišanim in znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih celične linije CHO der4

Poleg oznake gena so prikazani še vrednosti $\log_2FC$ in vrednost p. S sivo so označeni geni, ki imajo zvišano izražanje tudi pri MTX klonih (preglednica 37). Geni, označeni z odebeljenim tiskom, so bili izbrani za nadaljnje analize s qPCR.

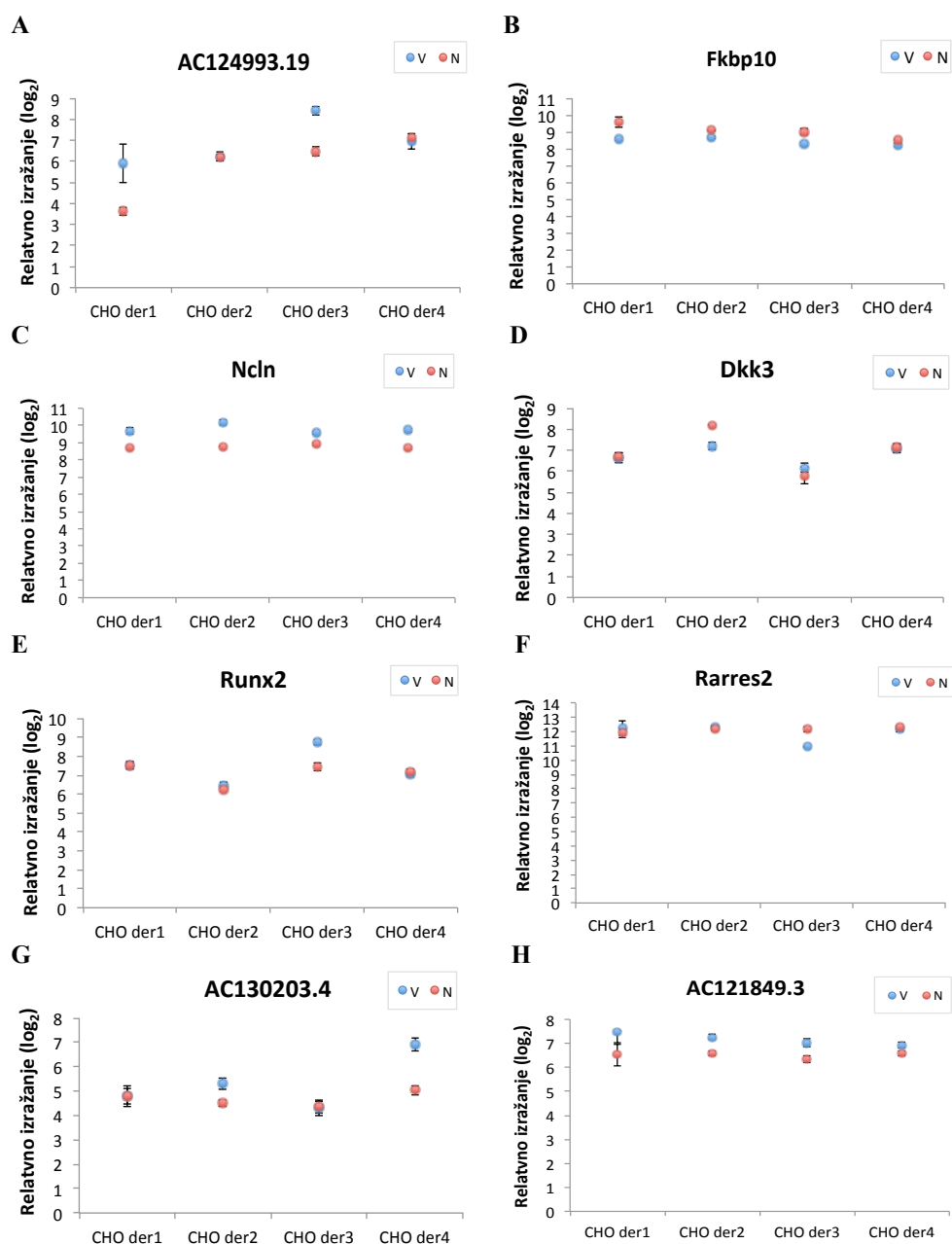
Table 45: List of significantly up- and down-regulated genes in high producing clones from the CHO der4 cell line

Shown are gene symbols (oznaka gena), $\log_2FC$ and P-values (vrednost p). Genes marked with grey are up-regulated also in MTX clones (table 37). Genes marked in bold were selected for further analyses with qPCR.

Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p	Oznaka	$\log_2FC$	Vrednost p
rDHFR	4,42	3,32E-04	AL929405.	1,09	2,02E-02
gen za Tv	3,64	1,47E-06	AL805899.	1,09	3,93E-03
gen za Lv	2,63	2,63E-04	Gsta3	1,09	5,17E-03
AC130203.4	1,88	7,71E-06	Stau2	1,06	4,14E-04
AC126552.5	1,62	3,64E-04	AC161359.	1,06	1,37E-02
CU024886.5	1,61	6,15E-04	Il19	1,05	1,18E-02
Gm11015	1,45	3,05E-02	Ncln	1,03	1,18E-06
DO270166.1	1,37	2,79E-04	Gm13318	1,02	1,77E-02
GH541371.1	1,29	3,45E-03	AC141328.	1,01	9,35E-04
AC132256.3	1,28	2,11E-03	Col12a1	1,00	2,22E-04
AC102693.9	1,26	1,79E-04	FG731489.	-1,83	4,41E-02
FM122822.1	1,21	2,31E-02	6330406115	-1,75	2,58E-02
Klhl4	1,21	9,72E-03	Col5a1	-1,14	3,32E-02
AC112269.3	1,16	1,39E-02	Adm	-1,05	5,87E-04
AC121854.2	1,10	4,74E-05	Ddit4	-1,04	6,67E-04

Izmed vseh naštetih genov v preglednicah od 40 do 45 smo na podlagi pregleda dejanskega izražanja za posamezni gen za nadaljnje analize (potrjevanje izražanja z metodo qPCR) izbrali gene: *AC124993.19*, *Fkbp10*, *Ncln*, *Dkk3*, *Runx2*, *Rarres2*, *AC130203.4* in *AC121849.3*. Nekatere gene smo izbrali, ker imajo značilno zvišano/znižano izražanje ($\log_2FC(ABS) > 1$, vrednost $p \leq 0,05$) pri visoko producirajočih klonih pri vsaj dveh celičnih linijah (npr. *AC124993.19* pri CHO der1 in CHO der3; *Ncln* pri CHO der2 in CHO der4), medtem ko so drugi geni zares značilni le za določeno celično linijo (*Dkk3* pri CHO der2; *Runx2* in *Rarres2* pri CHO der3). Preostala dva gena (*Fkbp10* in *AC130203.4*) smo izbrali, ker imata izrazito zvišano/znižano izražanje ($\log_2FC(ABS) > 1$, vrednost $p \leq 0,05$) pri visoko producirajočih klonih pri vsaj eni izmed celičnih linij in trend oz. zvišano/znižano izražanje z nižjimi pogoji ($\log_2FC(ABS) > 0,5$, vrednost $p \leq 0,05$) pri vsaj še dodatni celični liniji. Poleg vseh naštetih smo dodatno izbrali še gen *AC121849.3*, ki ima sicer vrednosti $\log_2FC$ nižje (0,8) od zgoraj postavljene meje (>1), vendar ima podobno kot gen *Ncln* konsistentno povišano izražanje pri visoko producirajočih klonih pri vseh 4 celičnih linijah.

Vrednosti relativnega izražanja vseh izbranih genov povprečno za posamezne celične linije so prikazane na sliki 31.



Slika 31: Primerjava relativnega izražanja izbranih genov pri visoko in nizko producirajočih klonih posameznih celičnih linij

Prikazani so log₂ normalizirane vrednosti, pridobljene z mikromrežami, in območje standardne napake. (A) *AC124993.19*, (B) *Fkbp10*, (C) *Ncln*, (D) *Dkk3*, (E) *Runx2*, (F) *Rarres2*, (G) *AC130203.4* in (H) *AC121849.3*. Z modro so prikazane povprečne vrednosti izražanja genov pri visoko producirajočih klonih (V), z rdečo pa povprečne vrednosti izražanja genov pri nizko producirajočih klonih (N) znotraj posamezne celične linije.

Figure 31: Comparison of relative expression for selected genes in high- and low producing clones at each CHO cell line

Shown are log₂ normalised values obtained with microarrays. (A) *AC124993.19*, (B) *Fkbp10*, (C) *Ncln*, (D) *Dkk3*, (E) *Runx2*, (F) *Rarres2*, (G) *AC130203.4* and (H) *AC121849.3*. The blue circles represent mean expression values for high producing clones (V) and the red circles represent mean expression values for low producing clones (N) at each CHO cell line. Error bars represent standard error.

4.5.2 Potrjevanje izražanja genov s PCR v realnem času

4.5.2.1 Testiranje na prisotnost genomske DNA

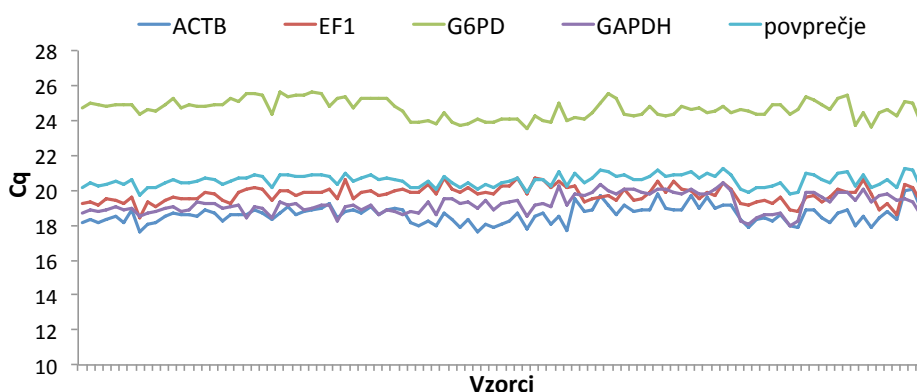
Pri vzorcih totRNA, ki smo jih obdelali z DNAzo, genomske DNA nismo zaznali. Pri dveh od štirih vzorcev totRNA pred obdelavo z DNAzo smo pri najvišji redčini zaznali genomsko DNA v obliki zelo poznih ciklov ($C_q = 36$). Ugotovili smo, da so vzorci totRNA (sploh po obdelavi z DNAzo) zelo čisti, brez prisotne DNA, ki bi lahko motila analizo izražanja genov z metodo qPCR.

4.5.2.2 Preverjanje ustreznosti testov TaqMan Gene Expression

S testom smo potrdili delovanje testov TaqMan Gene Expression. Pri redčinah 10 x in 100 x so se pri večini testov TaqMan Gene Expression in vzorcev vrednosti C_q gibale med 22 in 32, pri redčini 1000 x pa so bile vrednosti C_q navadno nad 30. Pri dveh testih TaqMan Gene Expression (*Slc17a6* in *AC130203*) so bile vrednosti C_q pri redčinah 100 x in 1000 x krepko nad 30 ali celo nezaznavne. Za testa TaqMan Gene Expression *Slc17a6* in *AC130203* smo za nadaljnje analize tako izbrali redčini 1 x in 10 x, za vse preostale teste pa redčini 10 x in 100 x.

4.5.2.3 Obdelava podatkov

Štirim genom smo preverili stabilnost izražanja v naših vzorcih in s tem njihov potencial za referenčne gene. S slike 32 je razvidno, da so krivulje za vse štiri gene (*ACTB*, *GAPDH*, *EF1* in *G6PD*) razmeroma vzporedne.



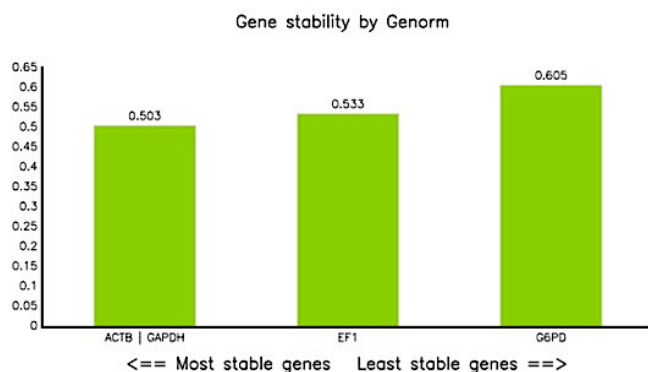
Slika 32: Vrednosti C_q štirih referenčnih (normalizatorskih) genov in povprečna vrednost C_q pri 103 vzorcih
Figure 32: C_q values of four reference (normalisation) genes and their average for 103 samples

Z uporabljenima statističnima programoma geNorm in NormFinder smo dobili primerljive rezultate (slika 33). V obeh primerih se je kot najboljši gen za normalizacijo izkazal gen *ACTB*, najmanj stabilno izražanje pa je imel gen *G6PD*. Stabilnostna vrednost (angl. gene stability value), pridobljena s programom geNorm, za noben gen ni bila večja kot 1

(Exposito-Rodriguez in sod., 2008), zato je za normalizacijo primerna geometrijska sredina izražanja vseh štirih genov.

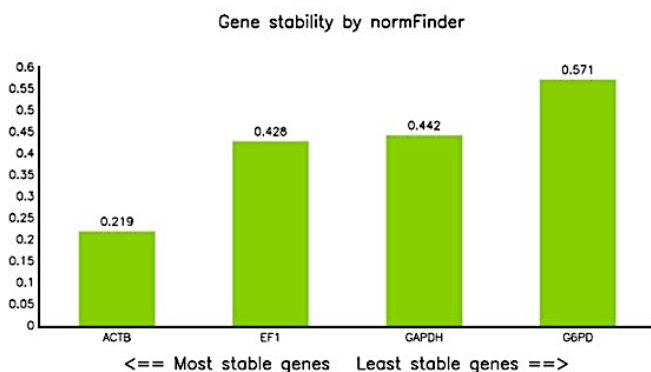
A

Gene name	Stability value
ACTB GAPDH	0.503
EF1	0.533
G6PD	0.605



B

Gene name	Stability value
ACTB	0.219
EF1	0.428
GAPDH	0.442
G6PD	0.571



Slika 33: Analiza primernosti referenčnih genov, dobljenih z uporabo statističnih programov (A) geNorm in (B) NormFinder

Vnesli smo vrednosti C_q za 103 vzorce in 4 gene: *ACTB*, *GAPDH*, *EF1* in *G6PD*.

Figure 33: Evaluation of four reference genes (*ACTB*, *GAPDH*, *EF1* and *G6PD*) using statistical softwares geNorm and NormFinder

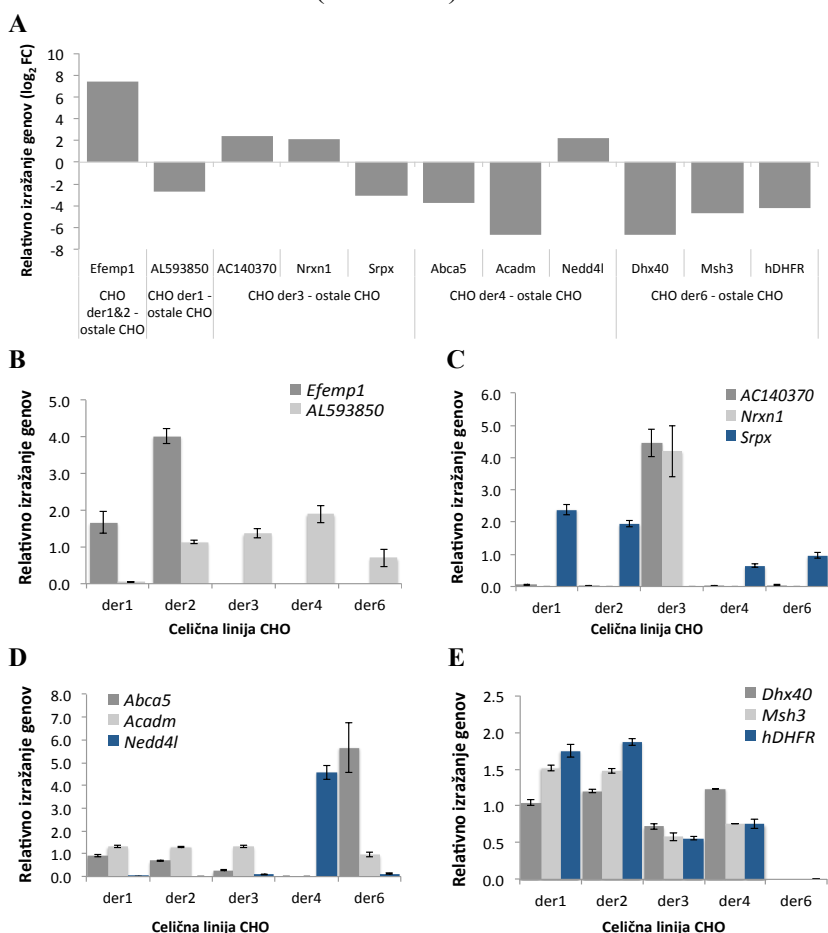
Results are calculated based on C_q values of 103 samples.

Za normalizacijo vseh rezultatov, pridobljenih s qPCR, smo tako uporabili geometrijsko sredino štirih referenčnih (normalizatorskih) genov.

4.5.2.3.1 Analiza transkriptoma starševskih celičnih linij

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z analizo transkriptoma z mikromrežami, smo za potrjevanje izražanja genov s qPCR izbrali 11 genov: *Efemp1*, *AL593850*, *AC140370*, *Nrxn1*, *Srpx*, *Abca5*, *Acadm*, *Nedd4l*, *Dhx40*, *Msh3* in *DHFR* (*hDHFR*).

Za vseh 11 genov so se rezultati izražanja genov, dobljeni s qPCR (slika 34, B-E), ujemali z rezultati z mikromrež (slika 34A).



Slika 34: Označevalni geni za ločevanje posamezne celične linije CHO

(A) Log₂ normalizirane vrednosti izražanja genov, analizirane z mikromrežami za gene, ki so specifični za posamezne celične linije. Pozitivne vrednosti predstavljajo zvišano, negativne vrednosti pa znižano izražanje gena. (B-E) Validacija rezultatov dobljenih z mikromrežami z metodo qPCR. Relativno izražanje genov, identificiranih glede na edinstveno izražanje (prisotnost/odsotnost zaganavnega izražanja genov) za (B) CHO der1 in CHO der2, (C) CHO der3, (D) CHO der4 in (E) CHO der6. Vsi podatki so bili normalizirani glede na 4 referenčne gene. Zaradi popolne odsotnosti izražanja genov v določenih primerih izračun log₂FC ni mogoč. Vsak stolpec na grafikonih B-E predstavlja povprečje relativnega izražanja genov z območji standardne napake za 23 vzorcev za celične linije CHO der1 do CHO der4 in 11 vzorcev za celično linijo CHO der6. Glej preglednico 46 za povzetek ekspresijskih profilov za vse analizirane celične linije.

Figure 34: Marker genes that differentiate the analysed CHO cell lines

(A) Log₂ normalised differential expression of the genes identified as unique for a specific cell line by microarrays. Positive values represent the up-regulated and negative values down-regulated genes. (B-E) qPCR validation of the microarray analysis. Relative expression of genes identified as unique (for expression or lack of expression) is shown for CHO der1 and CHO der2 cells (B), CHO der3 (C), CHO der4 (D), and for CHO der6 (E) cell lines. All of the data were normalised to the four reference genes. Normalised relative qPCR expression is shown where the unique mRNA is completely absent (not detected with qPCR) and consequently log₂FC values cannot be calculated. Each bar represents the mean expression of 23 samples for CHO der1 to CHO der4 cell lines, and 11 samples for the CHO der6 cell line. Error bars represent standard error. See table 46 for summary expression profiles across these parental CHO cell lines.

Preglednica 46: Povzetek rezultatov qPCR za gene z edinstvenim izražanjem, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije

Povzeto na podlagi slike 34. +/- prikazuje prisotnost/odsotnost zaznavnega izražanja genov.

Table 46: Summary of the qPCR results for the genes identified with unique expression for an individual cell line

Summarized from the data in figure 34. +/- indicates the presence/lack of detectable expression.

Celična linija CHO	Gen										
	<i>Efemp1</i>	<i>AL593850</i>	<i>AC140370</i>	<i>Nrxn1</i>	<i>Srpx</i>	<i>Abca5</i>	<i>Acadm</i>	<i>Nedd4l</i>	<i>Dhx40</i>	<i>Msh3</i>	<i>hDHFR</i>
der1	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+
der2	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+
der3	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+
der4	–	+	–	–	+	–	–	+	+	+	+
der6	–	+	–	–	+	+	+	–	–	–	–

Za ugotovitev, ali je v določenih primerih odsotnost zaznavnega izražanja genov posledica izgube gena, smo izvedli analizo qPCR na genomski DNA (3.7). Rezultati so prikazani v podpoglavju 4.5.2.3.1.1.

4.5.2.3.1.1 Določevanje prisotnosti določenih genov v genomu

Rezultati analize qPCR, ki smo jo izvedli za potrditev odsotnosti/prisotnosti določenih genov v genomu starševskih celičnih linij, so prikazani v preglednici 47. Vsi analizirani geni so prisotni v genomu starševskih celičnih linij, razen dveh genov (*hDHFR* in *Msh3*), ki manjkata v celični liniji CHO der6.

Preglednica 47: Analiza qPCR, izvedena na vzorcih genomske DNA starševskih celičnih linij

+/- nakazuje prisotnost/odsotnost analiziranih genov v genomu.

Table 47: qPCR analysis performed on genomic DNA isolated from the parental cell line samples

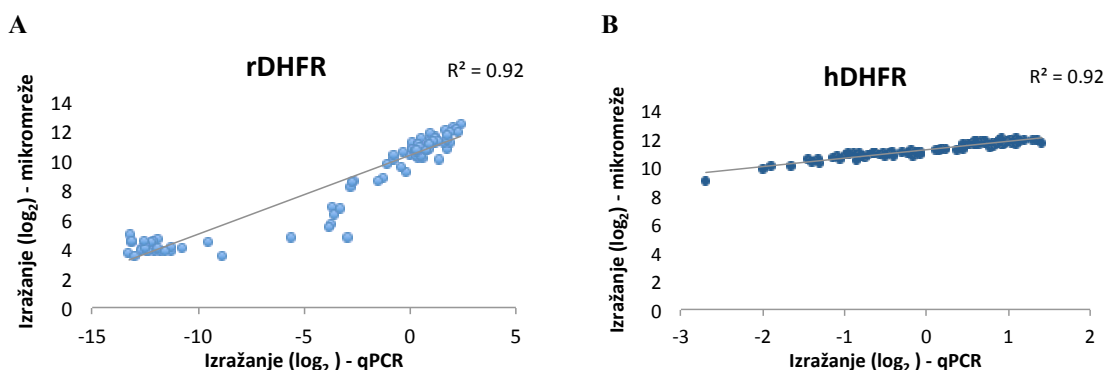
+/- indicates the presence/absence of analysed genes in the genomes.

Celična linija CHO	Gen										
	<i>Efemp1</i>	<i>AL593850</i>	<i>AC140370</i>	<i>Nrxn1</i>	<i>Srpx</i>	<i>Abca5</i>	<i>Acadm</i>	<i>Nedd4l</i>	<i>Dhx40</i>	<i>Msh3</i>	<i>hDHFR</i>
der1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
der2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
der3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
der4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
der6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–

4.5.2.3.2 Analiza izražanja *rDHFR*, *hDHFR* in *Neo*

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z analizo transkriptoma z mikromrežami, smo za potrjevanje izražanja s qPCR izbrali gene: *rDHFR*, *hDHFR* in *Neo*. Zadnji sicer ni prisoten na mikromrežah, vendar smo ga, ker je poleg gena *rDHFR* ključni selekcijski gen, za dopolnitev in potrditev celotne slike izražanja genov, odgovornih za selekcijo, prav tako analizirali s qPCR.

Zelo dobro ujemanje rezultatov izražanja genov *rDHFR* in *hDHFR*, pridobljenih z obema metodama (mikromeže in qPCR), je prikazano na sliki 35.

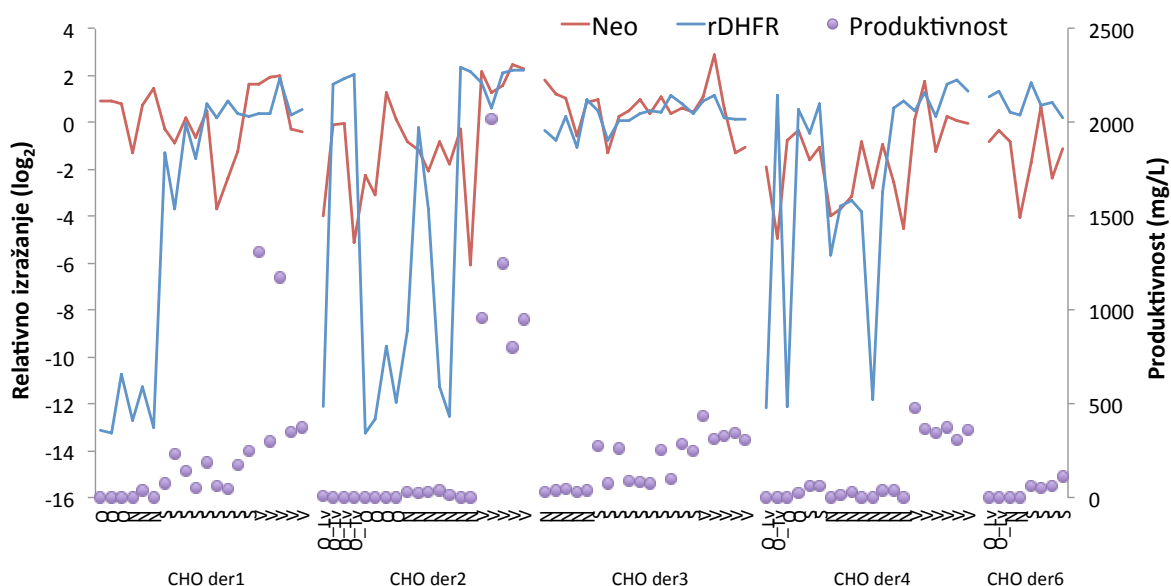


Slika 35: Prikaz ujemanja izražanja genov *rDHFR* in *hDHFR*, pridobljenih z mikromežami in qPCR
Rezultati so prikazani za vseh 103 vzorcev, analiziranih v študiji.

Figure 35: Scatter plot showing correlation of expression of (A) *rDHFR* and (B) *hDHFR* genes obtained by microarrays and qPCR

Shown are the results for all 103 samples analysed in the study.

Na sliki 36 so prikazani rezultati izražanja obeh selekcijskih genov *rDHFR* in *Neo*, ki smo jih z ekspresijskim vektorjem vnesli v celične linije. Videti je, da je gen *Neo* prisoten pri večini klonov, medtem ko gen *rDHFR* pri določenih klonih, ki izvirajo predvsem iz selekcije z G418, manjka (glej tudi sliko 24).



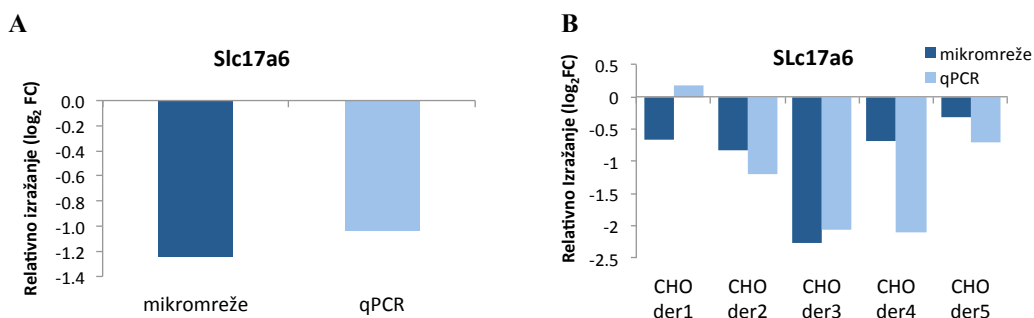
Slika 36: Relativno izražanje za *rDHFR* in *Neo*, pridobljeno s qPCR za posamezne celične linije. Prikazani so $\log_2$ normalizirane vrednosti izražanja genov in tudi produktivnost za posamezne kloni. Oznake: O = kloni z manjkajočima ali okvarjenima Lv in Tv, O_Lv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Lv, O_Tv = kloni z manjkajočo ali okvarjeno Tv, N = nizko producirajoči kloni, S = srednje producirajoči kloni, V = visoko producirajoči kloni.

Figure 36: Relative expression of *rDHFR* and *Neo* genes obtained with qPCR for each analysed CHO cell line

Shown are $\log_2$ normalised expression values and productivity values for each clone. Legend: O = clones with defective or missing light- and heavy chains, O_Lv = clones with a defective or missing light chain, O_Tv clones with a defective or missing heavy chain, N = low producing clones, S = medium producing clones, V = high producing clones.

4.5.2.3.3 Analiza transkriptoma na različnih selekcijskih stopnjah

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z analizo transkriptoma z mikromrežami, smo za potrjevanje izražanja s qPCR izbrali gen *Slc17a6*. Izražanje smo potrdili na vseh 88 G418 in MTX klonih (44 G418 in 44 MTX klonih). Rezultati, pridobljeni z obema metodama (mikromreže in qPCR), so prikazani na sliki 37. Izražanje, dobljeno z obema metodama, se je ujemalo pri vseh celičnih linijah, razen pri CHO der1.



Slika 37: Razlika v izražanju izbranih genov pri gojenju z G418 (G418 klonih) ali kombinacijo G418 in MTX (MTX klonih), dobljena z mikromrežami in qPCR

Prikazane so vrednosti $\log_2 FC$ za vse celične linije CHO hkrati (A) in posamezno po celičnih linijah (B). S temno modro so označene vrednosti, dobljene z mikromrežami, s svetlo modro pa vrednosti qPCR.

Figure 37: Difference in expression values for selected genes from the G418/MTX clones comparison obtained with microarrays and qPCR

Presented are fold change $\log_2$ ($\log_2 FC$) differences in expression values for all CHO cell lines together (A) and separately for each cell line (B). Dark blue colour represents microarray results and light blue qPCR results.

Podrobni rezultati in statistični podatki za izražanje gena *Slc17a6*, pridobljeni s qPCR, so prikazani v preglednici 48.

Preglednica 48: Povprečne vrednosti izražanja, pridobljene s qPCR, pripadajoči standardni odkloni, razlika v izražanju ter vrednosti p za gen *Slc17a6* v primerjavi G418 proti MTX klonom

Vrednosti so prikazane za vse celične linije hkrati ali posamezno po linijah. Razlika v izražanju je prikazana kot vrednost $\log_2 FC$.

Table 48: Average expression values with corresponding standard deviation values (st. odklon), P-values (vrednost p) and $\log_2 FC$ values for *Slc17a6* gene – comparison of G418 vs MTX clones

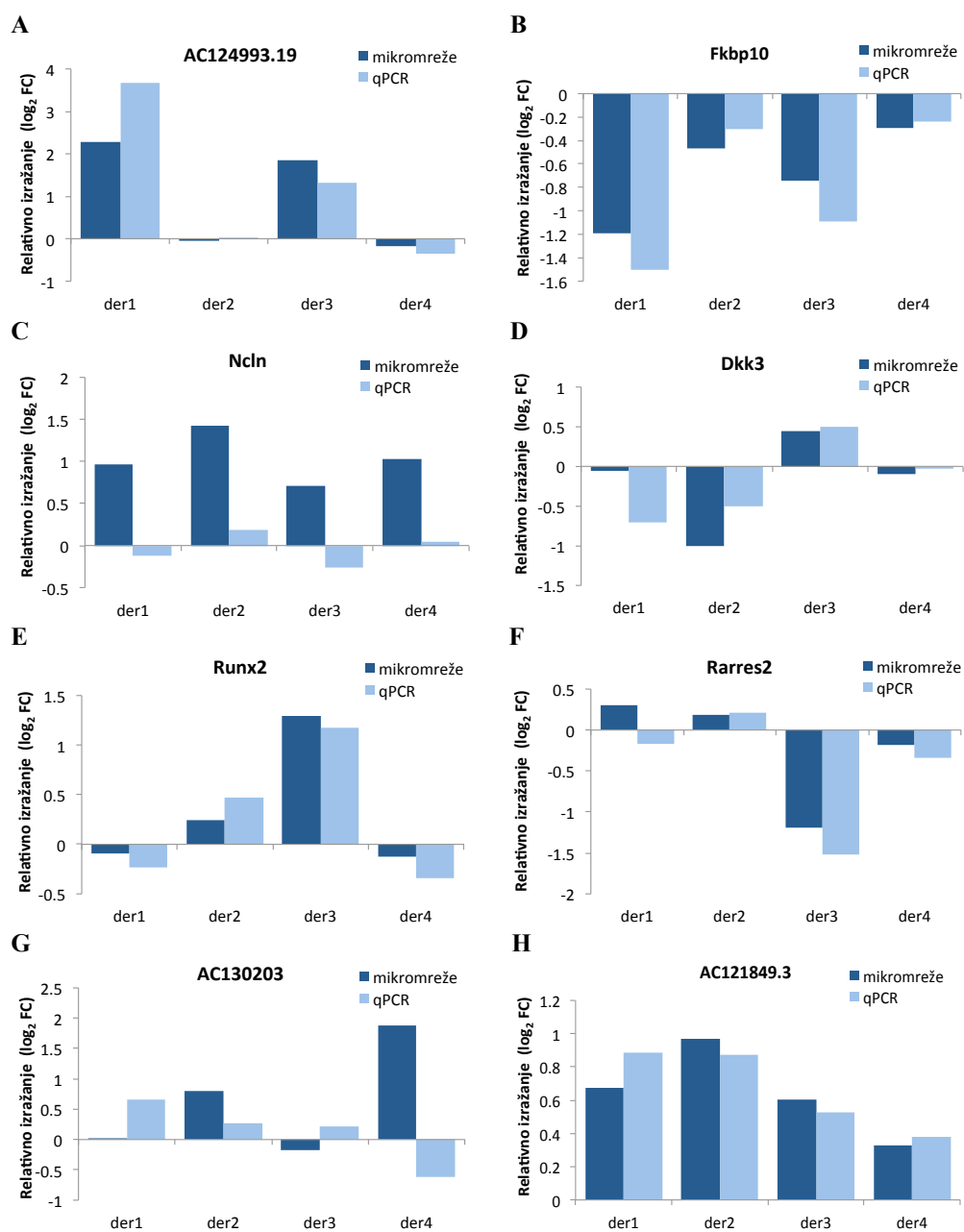
Values are shown for all cell lines or for each cell line separately.

		Vse linije	CHO der1	CHO der2	CHO der3	CHO der4	CHO der6
Povprečno izražanje ($\log_2$)	G418 kloni	2,58	2,48	4,02	2,02	1,68	2,92
	MTX kloni	3,83	3,68	3,84	4,08	3,79	3,62
St. odklon	G418 kloni	1,55	1,33	1,48	1,31	0,91	2,07
	MTX kloni	1,02	0,97	0,67	1,36	0,98	1,45
$\log_2 FC$ - G418 vs MTX kloni		1,55	-1,21	0,17	-2,06	-2,11	-0,70
Vrednost p		3,10E-05	3,36E-02	7,41E-01	2,84E-03	9,69E-05	6,03E-01

4.5.2.3.4 Analiza vpliva jakosti produkcije na transkriptom celičnih linij

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z analizo transkriptoma z mikromrežami, smo za potrjevanje izražanja s qPCR izbrali naslednje gene: *AC124993.19*, *Fkbp10*, *Ncln*, *Dkk3*, *Runx2*, *Rarres2*, *AC130203.4* in *AC121849.3*. Izražanje smo potrdili na vseh 47 visoko in nizko producirajočih klonih (22 V in 25 N klonih). Rezultati, pridobljeni z obema metodama (mikromreže in qPCR), so prikazani na sliki 38.

Za 6 (*AC124993.19*, *Fkbp10*, *Dkk3*, *Runx2*, *Rarres2* in *AC121849.3*.) izmed 8 genov so se rezultati izražanja ujemali pri obeh metodah. Pri dveh genih (*Ncln* in *AC130203.4*) nam rezultatov izražanja, dobljenih z mikromrežami z metodo qPCR, ni uspelo potrditi. Zaradi neujemanja rezultatov izražanje gena *Ncln*, ki je sprva izgledal kot zanesljiv genetski označevalec, smo qPCR ponovili in preverili s tremi seti začetnih oligonukleotidov in sond (preglednica 15). Vsi so pokazali enake rezultate.



Slika 38: Razlika v izražanju izbranih genov pri visoko/nizko producirajočih klonih, dobljena z mikromrežami in qPCR

Predstavljene so vrednosti log₂ FC za 4 celične linije CHO: der1 do der4. S temno modro so označene vrednosti, dobljene z mikromrežami, s svetlo modro pa vrednosti qPCR.

Figure 38: Difference in expression values for selected genes in the high/low producing clones comparison obtained with microarrays and qPCR

Presented are fold change log₂ (log₂ FC) differences in expression values for four CHO cell lines: der1 – der4. Dark blue colour represents microarray results and light blue qPCR results.

Podrobni rezultati izražanja genov, ki so značilni za določeno celično linijo ali njihovo kombinacijo, pridobljeni s qPCR, so prikazani v preglednici 49.

Preglednica 49: Povprečne vrednosti izražanja, pridobljene s qPCR, pripadajoči standardni odkloni, razlika v izražanju ter vrednosti p za izbrane gene v primerjavi visoko producirajočih (V) proti nizko producirajočim (N) klonom

Vrednosti so prikazane za celične linije CHO der1, CHO der2 in CHO der3. Prikazani geni imajo (A) zvišano ali (B) znižano izražanje pri visoko producirajočih klonih. Razlika v izražanju je prikazana kot vrednost $\log_2FC$.

Table 49: Average expression values ($\log_2$) with corresponding standard deviation values (st. odklon), P-values (vrednost p) and $\log_2FC$ values for each gene – high (V) and low (N) producing clones for CHO der1, CHO der2 and CHO der3 cell lines

Up-regulated genes in high producing clones are presented in table A and down-regulated genes in high producing clones are presented in table B.

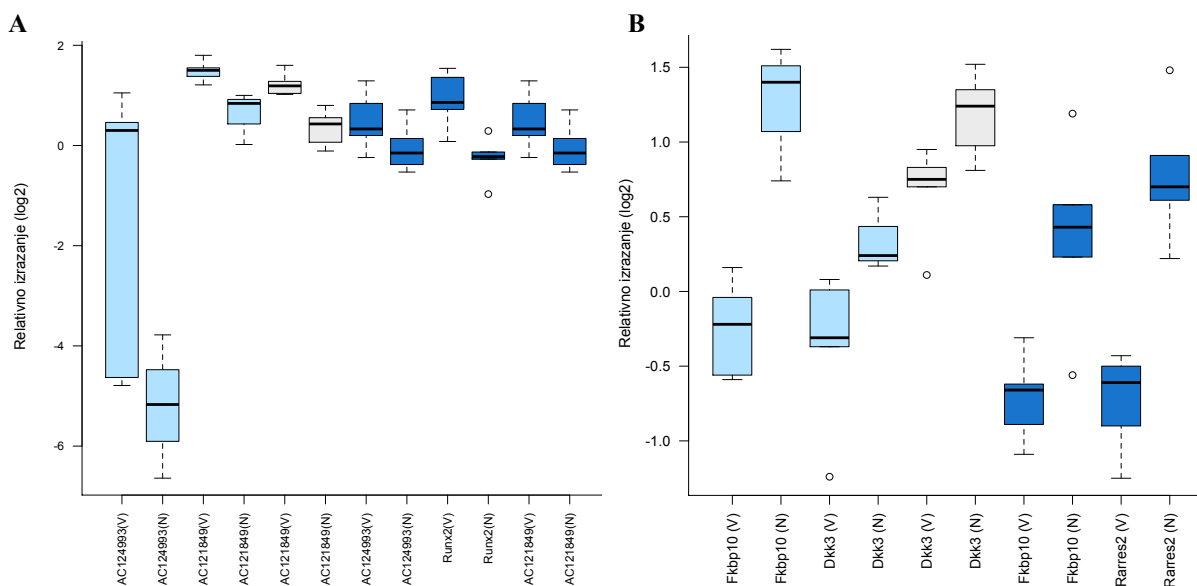
A

	Oznaka gena	CHO der1		CHO der2	CHO der3		
		<i>AC124993.19</i>	<i>AC121849.3</i>	<i>AC121849.3</i>	<i>AC124993.19</i>	<i>Runx2</i>	<i>AC12184</i>
Povprečno izražanje ($\log_2$)	V kloni	-1,52	1,49	1,23	0,90	0,91	0,48
	N kloni	-5,20	0,62	0,34	-0,41	-0,26	-0,04
St. odklon	V kloni	2,93	0,22	0,24	0,62	0,57	0,59
	N kloni	1,43	0,53	0,34	0,32	0,45	0,49
$\log_2FC$ - V vs N kloni		3,68	0,87	0,89	1,31	1,17	0,53
Vrednost p		5,00E-02	9,14E-02	3,27E-04	5,48E-03	7,88E-03	1,65E-01

B

	Oznaka gena	CHO der1		CHO der2	CHO der3	
		<i>Fkbp10</i>	<i>Dkk3</i>	<i>Dkk3</i>	<i>Rarres2</i>	<i>Fkbp10</i>
Povprečno izražanje ($\log_2$)	V kloni	-0,25	-0,36	0,67	-0,74	-0,72
	N kloni	1,25	0,35	1,17	0,78	0,37
St. odklon	V kloni	0,33	0,53	0,33	0,34	0,29
	N kloni	0,46	0,25	0,26	0,46	0,63
$\log_2FC$ - V vs N kloni		-1,50	-0,71	-0,50	-1,52	-1,09
Vrednost p		1,32E-02	4,26E-02	2,24E-02	4,83E-04	1,42E-02

Na sliki 39 sta prikazana grafikona kvantilov z namenom dodatne vizualizacije rezultatov. Vsak gen je predstavljen z dvema grafikonoma, prvi predstavlja izražanje določenega gena pri visoko producirajočih klonih (V), drugi grafikon pa izražanje pri nizko producirajočih klonih (N). Črna črta na sredi grafikonov predstavlja mediano izražanja genov za določene skupine klonov.



Slika 39: Prikaz izražanja 6 označevalnih genov, značilnih za visoko produktivnost

Prikazani so grafikon kvantilov $\log_2$ normaliziranih vrednosti izražanja, pridobljenih s qPCR. Geni z zvišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih (V) v primerjavi z nizko producirajočimi kloni (N) so prikazani na grafikonu (A), na grafikonu (B) pa z znižanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih. Svetlo modra barva predstavlja celično linijo CHO der1, siva CHO der2 in temno modra CHO der3.

Figure 39: Gene expression of 6 marker genes specific for high productivity

Presented are Box Whisker plots showing $\log_2$ normalised expression values for high (V) and low (N) producing clones based on the qPCR. Up-regulated genes are presented in (A) and down-regulated in (B). Light blue colour represents CHO der1, the gray CHO der2 and dark blue CHO der3 cell lines.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izbor celičnih linij

Za poskus analize transkriptoma smo izbrali 5 celičnih linij CHO, ki izvirajo iz treh različnih vej razvoja (slika 5). Izbor se je izkazal za dobrega, saj je vseh pet analiziranih celičnih linij po ekspresijskih profilih zelo različnih. To je omogočilo identifikacijo transkriptov, s katerimi lahko ločujemo posamezne celične linije med seboj, kar prej ni bilo mogoče. Ker ima vsaka izmed analiziranih celičnih linij svoj specifični transkriptom, je bilo število ključnih genov za produktivnost, ki bi bili uniformni pri vseh linijah, posledično manjše. Ob teh rezultatih in dodatnem predvidevanju, da je produktivnost verjetno posledica manjših sprememb v ravneh izražanja večjega števila genov z različnimi funkcijami (Seth in sod., 2007), smo se osredotočili tudi na primerjave med različno producirajočimi kloni znotraj posamezne celične linije, kjer je bilo število identificiranih različno izraženih genov po pričakovanju višje.

Z izborom širokega nabora celičnih linij in klonov z različnimi lastnostmi nam je uspelo potrditi tudi, da so kloni glede na celostno izražanje genov bolj podobni starševskim celičnim linijah, iz katerih izvirajo (slika 18), kot pa klonom s podobnimi rastnimi ali produkcijskimi sposobnostmi.

5.1.2 Ločevanje celičnih linij CHO na podlagi njihovih kariotipov

Poleg sekvenciranja in analize genoma, ki je še vedno dokaj draga metoda, sestavljanje zaporedij pa kompleksno, lahko dodatne informacije o genomu celičnih linij pridobimo tudi z analizo kariotipov. Tudi pri tem je pristop karakterizacije včasih zapleten, saj so celične linije v zadnjih 50 letih, odkar so bile spontano imortalizirane, svoje kromosome zelo spremenile, povrh pa so njihovi karitopi nestabilni (Worton in sod., 1977; Wurm in Hacker, 2011). Na splošno je znano, da so celice CHO naravno podvržene prerazporeditvam kromosomov, ki so posledica postopkov, s katerimi so nastale starševske celične linije (npr. z mutagenezo, kloniranjem itd.), adaptacije na brezserumsko gojišče in na stresalne pogoje, selekcije z antibiotikom in amplifikacije genov z metotreksatom, dolgotrajnega gojenja v kulturi (v povprečju 3 mesece) in drugih razlogov.

Prerazporeditve delov kromosomov so opazne tudi pri kariotipih naših celičnih linij CHO. Podobno kot pri izvorni celični liniji (slika 2) so pri vseh analiziranih celičnih linijah CHO prisotni kromosomi od 1 do 6, ki so najbolj podobni hrčkovim, medtem ko pri vseh manjka kromosom 7, kar je skladno z rezultati, ki sta jih dobila Deaven in Petersen (1973). Kromosom 8 je videti precej prerazporejen in različen med linijami. Enako velja za preostale kromosome, ki so prav tako bolj ali manj prerazporejeni in kot taki predstavljajo derivatne ali celo popolnoma novonastale kromosome pri posameznih linijah. Zanimivo je

tudi, da sta le celični liniji CHO der3 in der4 poliploidni oz. mešanici poliploidov, kar se ujema tudi s skupnim izvorom.

Pristop barvanja kromosomov po Giemsi bi bil uporabna metoda za ločevanje med linijami, vendar je, ker so celice večinoma diploidne narave ali celo mešanica diploidov s poliploidi, natančno ločevanje oteženo. Sploh ločevanje rekombinantnih klonalnih linij, ki so bile podvržene številnim manipulacijam znotraj njihovega razvoja, kar pomeni, da se končni klon po kariotipu lahko bistveno ločuje od kariotipa starševske celične linije, iz katere izvira. Povrhu je metoda z barvanjem po Giemsi premalo natančna, da bi zares ločili majhne, a pogoste spremembe na kromosomih. Natančnejše ločevanje celičnih linij na podlagi izgleda in števila kromosomov bi lahko dosegli z novjšimi pristopi metod, kot je npr. mFISH (angl. multicolor FISH), ki temelji na uporabi za hrčka specifičnih fluorescentno označenih sond. V tem primeru so sonde specifične za posamezne kromosome in so svojevrstnih barv, kar se kaže tudi v bolj natančnih in specifičnih kariotipih. Vsak kromosom je potem obarvan s svojo barvo ali kombinacijo barv, kar omogoča tudi spremljanje kromosomskih prerazporeditev in iskanje t. i. označevalnih kromosomov, ki bi bili specifični le za posamezno celično linijo. Drugi pristop karakterizacije celičnih linij CHO je mogoč tudi z analizo transkriptoma, kar se je v naši študiji izkazalo za zelo uspešno.

5.1.3 Načrt procesa priprave končne produkcijske celične linije

Razvoj celične linije za produkcijo biološko podobnih zdravil se navadno začne z naborem več starševskih celičnih linij in tudi ekspresijskih vektorjev z enakim zapisom za transgene in različnimi regulatornimi elementi. Na začetku razvoja je za zagotavljanje čim večje podobnosti biološko podobnih zdravil z originatorskimi tako pomembna čim večja variabilnost, ki se nato med razvojem procesa postopoma oža do izbora končne produkcijske linije oz. klona, ki vsebuje izbrani ekspresijski vektor. Eden izmed namenov naloge je bil tudi morebitno zmanjšanje števila celičnih linij in/ali ekspresijskih vektorjev že na začetku zasnovanja procesa priprave končne produkcijske celične linije.

Naš celotni poskus je bil zastavljen na petih najpogostejše uporabljenih celičnih linijah CHO za produkcijo biološko podobnih zdravil v Leku in dveh ekspresijskih vektorjih, kar je skupno nanese 121 vzorcev, vendar smo zaradi ugotovitev, ki niso bile del te študije, vzorce, transficirane z ekspresijskim vektorjem B, izločili. Ugotovili smo, da na zadnjem manjka fragment, ki bi lahko ključno vplival na izražanje transgenov in tudi na celoten ekspresijski profil. Dodatno smo z znanjem, ki izvira iz izkušenj z več projektov, ugotovili, da je verjetnost, da bi razvoj rekombinantnih celičnih linij potekal z manjšim številom vektorjev in tudi celičnih linij, majhna, saj je na začetku razvoja ključnega pomena čim večja variabilnost. Ta se znotraj razvoja do izbora končnega klona in posledično celične linije, transficirane z enim ekspresijskim vektorjem, oža postopoma in predvsem na podlagi karakterizacije kakovosti produkta z analitskimi metodami (npr. analiza glikanov, električnega naboja proteinov, velikosti proteinov, biološke afinitete in aktivnosti itd). Na

kakovost produkta pa lahko poleg genetske zasnove celičnih linij zelo vpliva tudi proces gojenja celic.

Ob vsem je za zoožanje začetnega števila starševskih celic in ekspresijskih vektorjev potrebno znanje, tudi na podlagi statističnega modeliranja npr. parametrov procesa itd., saj je smiselno upoštevanje podatkov in izkušenj iz več projektov, medtem ko je naša študija potekala znotraj enega projekta oz. so bile celice transficirane z genoma, ki nosita zapis za eno monoklonsko protitelo, IgG.

V večini primerov produktivnost pri mešani populaciji celic nakazuje potencial produktivnosti, ki ga lahko pričakujemo pri klonih. Kot najvišje producirajoča linija se je tako na ravni mešanih populacij celic in tudi klonov izkazala CHO der3, najnižje producirajoča pa CHO der6.

Čeprav smo ustvarili ogromno število klonov (več kot 700) in zagotovili, da kloni izvirajo iz več transfekcijskih mešanih populacij celic, da bi zaobjeli čim večjo variabilnost, nam pri celični liniji CHO der6 visoko producirajočih klonov ni uspelo dobiti. Celične linije CHO der6 zato nismo vključili v analize produktivnosti, pri čemer smo se osredotočili na primerjavo visoko in nizko producirajočih klonov CHO. Za celično linijo CHO der6 bi bila potrebna ponovitev kloniranja oz. še večji nabor klonov (tudi iz drugih projektov) in karakterizacija, omejena le na to specifično celično linijo, verjetno s prilagojenimi oz. znižanimi mejami za visoko produktivnost.

5.1.4 Število kopij genov za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa in vpliv na produktivnost

Eden izmed ciljev analiziranja vzorcev na ravni DNA je bil kvantifikacija in potrditev prisotnosti transgenov, še posebej pri nizko producirajočih klonih. Izkazalo se je, da pri približno 40 % (17 izmed 42 klonov) nizko producirajočih klonih (preglednica 20 in slika 13) ni prišlo do vključitve transgenov v genom oz. se je vključil le eden izmed genov za lahko ali pa težko verigo. Ker je odsotnost zapisa za lahko in težko verigo mAb ali le eno izmed njih očiten razlog za nizko produktivnost in ni posledica razlik v izražanju genov, smo klone z okvarjenim zapisom za enega ali oba transgena izločili iz analiz vpliva produktivnosti na transkriptom.

Število kopij genov za lahko in težko verigo je bilo pri vseh analiziranih klonih različnih produktivnostih, razen nekaj izjem, v povprečju razmeroma nizko (med 1 in 2), kar nakazuje na to, da visoka produktivnost ni odvisna od velikega števila kopij, ki se stabilno vgradijo v genom. Rezultati so skladni z avtorji (Chusainow in sod., 2009; Edros in sod., 2013; Kim in sod., 1998; Lattenmayer in sod., 2007; Reisinger in sod., 2008), ki so ugotovili, da so razlogi za to v transkripcijskih in posttranskripcijskih omejitvah pri klonih z zelo visokim številom kopij genov, prerazporeditvah kromosomov ali celo vključitvi transgenov v neaktivni del kromatina.

Pravzaprav je z vidika razvoja rekombinantnih celičnih linij zaželeno čim nižje število kopij transgenov, saj so tako kloni bolj obvladljivi s stališča genetskih stabilnostnih študij. Pri teh je namreč pomembno, da število v genom vgrajenih kopij skozi čas ostaja enako, pomembno pa je tudi čim manjše nihanje v produktivnosti (Chusainow in sod., 2009; Dorai in sod., 2012; Kim in sod., 2011).

Razmerje med številom kopij genov za Lv/Hv je dokaj usklajeno (približno 1) za večino klonov in najverjetnje ni razlog za razlike v produktivnosti med kloni (preglednica 20 in slika 13).

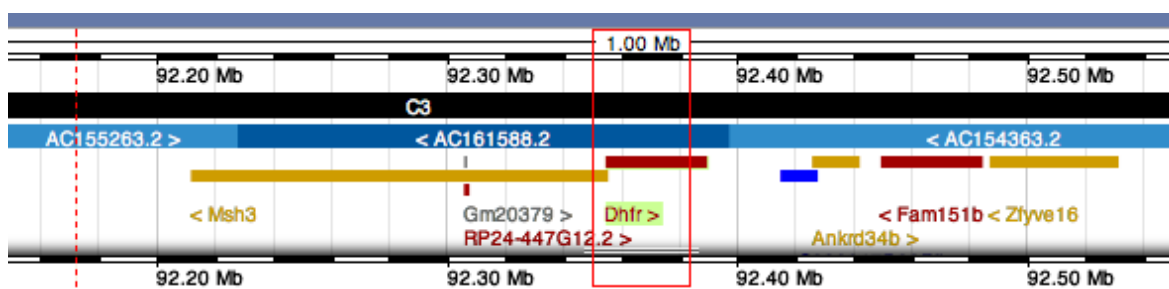
5.1.5 Identifikacija označevalnih genov za ločevanje različnih celičnih linij

Analiza glavnih komponent (slika 18), vennovi diagrami (slika 20) in tudi število različno izraženih genov med posameznimi pari starševskih celičnih linij (slika 21) nakazujejo na to, da so starševske celične linije CHO po ekspresijskih profilih tako različne, da njihovi transkriptomi predstavljajo dobro osnovo za ločevanje med njimi. Celični liniji CHO der1 in CHO der2 sta si najbolj podobni, kar se kaže v najnižjem številu različno izraženih setov sond oz. genov med tema dvema celičnima linijama. Po drugi strani so bile celice CHO der6 podvržene najbolj obširnim genetskim modifikacijam, kar se kaže v najvišjem številu različno izraženih genov v primerjavi z vsemi drugimi starševskimi celičnimi linijami. Te ugotovitve dopolnjujejo in se ujemajo z zgodovino starševskih celičnih linij (slika 5). Tudi število edinstveno izraženih setov sond (preglednica 21) je skladno s številom manipulacij, ki jim je bila podvržena posamezna starševska celična linija.

Z mikromrežami smo za vsako analizirano celično linijo identificirali večje število genov oz. njihovih transkriptov (preglednica 22), s katerimi lahko ločujemo med njimi ne glede na stopnjo v razvoju rekombinantne celične linije. Identificirani geni so namreč edinstveni za starševske celične linije in tudi producirajoče celične linije oz. končne produkcijske klone. Za celične linije CHO der3, der4 in der6 so bili taki geni številčni, medtem ko pri primerjavi CHO der1 ali CHO der2 s preostalimi celičnimi linijami edinstvenih genov ni bilo. Ti dve celični liniji sta, kot že omenjeno, med najmanj spremenjenimi in med najbolj sorodnimi med analiziranimi celičnimi linijami. Zadnji dve celični liniji lahko ločujemo tako, da ju z edinstvenimi geni za obe celični liniji hkrati najprej ločimo od preostalih, nato pa med njima ločimo z geni, ki ločujejo CHO der1 ali CHO der2.

Izmed več kot 160 edinstvenih genov (preglednica 22) smo izbrali 11 genov, za katere smo potrdili izražanje, pridobljeno z mikromrežami, tudi z neodvisno metodo qPCR (slika 34 in preglednica 46). Celični liniji CHO der1 in CHO der2 lahko od preostalih ločimo s transkriptom *Efemp1*, med njima pa nadalje s transkriptom *AL593850*. Celično linijo CHO der3 lahko od preostalih ločimo z edinstvenim izražanjem genov *AC140370*, *Nrxn1* in *Srpx*, CHO der4 z edinstvenim izražanjem genov *Abca5*, *Acadm* in *Nedd4l* ter CHO der6 z edinstvenim izražanjem genov *Dhx40*, *Msh3* in *hDHFR*. Za ugotovitev, ali je v določenih

primerih odsotnost zaznavnega izražanja genov posledica izgube gena, smo izvedli analizo qPCR na genomski DNA in potrdili, da so vsi analizirani geni prisotni v genomu starševskih celičnih linij, razen dveh genov (*hDHFR* in *Msh3*), ki manjkata v celični liniji CHO der6. Da pri celični liniji CHO der6, ki izvira iz CHO-DG44 (slika 5), manjka gen za DHFR, je skladno s pričakovanjem, kar so večkrat dokazali in poročali že drugi (Lewis in sod., 2013; Urlaub in Chasin, 1980; Urlaub in sod., 1983). Razlago, da poleg *hDHFR* pri CHO der6 manjka tudi gen *Msh3*, lahko iščemo v nastanku celične linije CHO-DG44. Ko sta Urlaub in Chasin (1983) z mutagenezo želela onesposobiti gen *DHFR*, sta poleg njegove izgube iz genoma izbila tudi gen za *Msh3*, saj ta leži poleg *DHFR* v genomu. Dokaz za to smo našli v pregledovalniku genoma na spletni strani baze Ensembl (slika 40).



Slika 40: Prikaz genov *DHFR* in *Msh3* na mišjem kromosomu 13 (ENSEMBL, 2014)

Figure 40: Location of *DHFR* and *Msh3* genes on mouse chromosome 13 (ENSEMBL, 2014)

Da pri celični liniji CHO-DG44 in posledično CHO der6 v genomu manjka *Msh3*, je tudi skladno s študijo sekvenciranja, ki so jo izvedli Lewis in sod. (2013). Poleg tega so v omenjeni študiji potrdili, da pri izvorni celični liniji CHO-K1 manjkajo določeni geni, ki so prisotni v genomu hrčka, in da preostale analizirane celične linije v genomu prav tako nimajo določenih genov. Teh popolnoma manjkajočih genov je malo (nekaj 10). Lewis in sod. (2013) so se osredotočili le na popolnoma manjkajoče gene v genomu, medtem ko je genov z okvarjenim ali skrajšanim zapisom, z okvarjenimi promotorskimi elementi verjetno precej več. Vse to so lahko potencialni vzroki za odsotnost zaznavnega izražanja edinstvenih genov pri posameznih celičnih linijah, ki smo jih identificali v naši študiji.

Poleg omenjenih razlogov, zakaj je mRNA za določene gene pri nekaterih celičnih linijah zaznavna, pri drugih pa pod mejo detekcije, čeprav je gen dokazano prisoten v genomu, je dodatnih razlogov lahko več. Raven mRNA med drugim določata dva ločena procesa: transkripcija, ki jo katalizira RNA polimeraza II, in razgradnja molekul mRNA, ki enakovredno pripomoreta h količini mRNA. Zelo verjetno so organizmi in različne celične linije razvili mehanizem, ki usklajuje ta dva procesa (Goler-Baron in sod., 2008). Na transkripcijo in posledično količino mRNA lahko tako izrazito vplivajo okvarjena promotorska zaporedja ali manjkajoči transkripcijski faktorji. Zmanjšanje količine mRNA je lahko posledica utišanja genov, ki vodi v razgradnjo molekul mRNA in jo včasih celo spremlja pojav deacetilacije histonov in/ali metilacije histonov ali promotorjev (Chusainow in sod., 2009; Mutskov in Felsenfeld, 2004; Richards in Elgin, 2002). Po drugi strani imajo evkariontske celice razvit poseben mehanizem razgradnje napačnih transkriptov (angl.

nonsense-mediated decay – NMD), s katerimi celice uničijo molekule mRNA, pri katerih se procesiranje pre-mRNA v jedru ni uspešno zaključilo, ali pa imajo zapis tako okvarjen, da nastanka pravilnega polipeptida ne bi bilo (Baker in Parker, 2004; Danckwardt in sod., 2002). Poškodovane mRNA se razgradijo hitro, očitno še pred nakopičenjem poškodovanega produkta, saj bi ti lahko neugodno vplivali na celice. Celice z mehanizmom NMD razgradijo številne aberantne mRNA, ki so lahko posledica mutacij ali nepravilnega procesiranja molekul pre-mRNA. Substrati za razgradnjo z mehanizmom NMD so lahko transkripti, ki vsebujejo nesmiselne mutacije ali premik bralnega okvira, ki je lahko odgovoren za uvedbo prezgodnjih stop kodonov translacije (Baker in Parker, 2004; Danckwardt in sod., 2002; Lewis in sod., 2003), transkripti z odprtim bralnim okvirjem na koncu 5' (Oliveira in McCarthy, 1995), predolge neprevedljive regije na koncu 3' (ki lahko spremenijo prostorsko odvisnost med terminacijskim kodonom in poli-A-repom) (Muhlrad in Parker, 1999) in tudi bicistronske mRNA (He in sod., 2003).

Biološki kontekst razlik v transkriptomu analiziranih celičnih linij CHO smo dodatno ovrednotili z analizo s programom GSEA. Celične linije CHO der1 in CHO der6 imajo med skupinami genov s povišanim znižanjem (preglednice od 24 do 32) veliko takih, ki so v povezavi s celično adhezijo ali tvorbo skupkov (npr. GO: 0050840 extracellular matrix binding, GO: 0051015 actin filament binding, GO: 0005518 collagen binding, GO: 0045296 cadherin binding, GO: 0043236 laminin binding, GO: 0005522 profilin binding, GO: 0010811 positive regulation of cell-substrate adhesion, GO: 0007155 cell adhesion, GO: 0030199 collagen fibril organization, GO: 0007160 cell-matrix adhesion itd.). Nekatere skupine genov izmed naštetih imajo nasprotno znižano izražanje pri celičnih linijah CHO der3 in der4. Pri celičnih linijah CHO der1 in der6 smo dejansko opazili, da se v kulturi občasno tvorijo celični skupki, pri čemer se celice iz neznanih razlogov lepijo druga na drugo, medtem ko je pojav celičnih skupkov pri preostalih celičnih linijah odsoten ali zelo redek. Ker celični skupki lahko vplivajo na rast in tudi produktivnost, je možno, da so geni v teh skupinah odgovorni tudi za zelo nizko produktivnost celične linije CHO der6. Ker proučevanje celičnih skupkov in adhezije ni bilo načrtovano v tej študiji, bi bilo treba za zanesljive zaključke izvesti dodatne poskuse, pri katerih bi opazovali nastajanje skupkov in izvedli primerjalno analizo izražanja genov pri vzorcih s skupki in brez njih.

Dodatno je iz analize GSEA razvidno tudi, da je pri celičnih linijah (predvsem CHO der6 in tudi CHO der1), kjer imajo zvišano izražanje skupine genov, ki bi lahko bile povezane s tvorbo celičnih skupkov, znižano izražanje skupine genov, ki so vključene v aktivno rast celic (npr. GO: 0006260 DNA replication, GO: 0007126 meiosis, GO: 0051301 cell division, GO: 0007067 mitosis, GO: 0006270 DNA replication initiation, GO: 0051276 chromosome organization, GO: 0006397 mRNA processing, GO: 0006406 mRNA export from nucleus, GO: 0051298 centrosome duplication, GO: 0003743 translation initiation factor activity, GO: 0000775 chromosome, centromeric region, GO: 0000793 condensed chromosome, GO: 0000794 condensed nuclear chromosome, GO: 0000784 nuclear

chromosome, telomeric region, GO: 0010467 gene expression). Za CHO der6 je ob vsem znano, da je med najslabše rastočimi izmed analiziranih celičnih linij.

Z analizo transkriptoma neproducirajočih celičnih linij smo dokazali, da je podobnost transkripcijskih profilov odvisna od zgodovine nastanka starševskih celičnih linij, vendar neodvisna od manipulacijskih korakov (kloniranje, selekcije z različnimi selekcijskimi agenti itd.), ki so značilni za razvoj rekombinantnih celičnih linij. Dodatno smo pokazali, da določene transkripte lahko uporabimo kot označevalne za ločevanje različnih rekombinantnih celičnih linij, ki izvirajo iz iste starševske celične linije.

Metode, ki temeljijo na NGS, so dokazano uporabne za iskanje razlik v genomu med različnimi celičnimi linijami, vendar so še vedno razmeroma drage, analiza velike količine podatkov pa zamudna in zapletena. S svojo študijo smo dokazali, da lahko različne celične linije CHO uspešno ločujemo z uporabo stroškovno učinkovitih metod, kot je npr. qPCR. Identificirani označevalni geni za ločevanje celičnih linij tako predstavljajo novo orodje za identifikacijo izvora celične linije, ki je bila podvržena različnim manipulacijam v razvoju rekombinantne celične linije. Ker se proces razvoja rekombinantne celične linije začne z več starševskimi celičnimi linijami, pomeni tovrstna identifikacija na podlagi izražanja genov pomembno orodje za zagotavljanje čedalje večjih zahtev po vzdrževanju visokih ravni kakovosti v laboratorijih farmacevtske industrije.

5.1.6 Primerjava izražanja vnesenega *rDHFR* in endogenega *hDHFR*

Želeli smo analizirati izražanje selekcijskih genov, prisotnih na ekspresijskem vektorju (*rDHFR* in *Neo*). Z mikromrežami smo analizirali izražanje *rDHFR* in ga primerjali z izražanjem endogenega *hDHFR*. Izražanje *rDHFR* in *hDHFR* smo potrdili s qPCR in s to metodo analizirali tudi izražanje gena *Neo*, ki na mikromrežah ni prisoten.

Hrčkov *DHFR* ima najvišje izražanje pri celičnih linijah CHO der1 in der2, sledita CHO der3 in der4, medtem ko pri CHO der6 izražanja tega gena nismo zaznali. Za zadnjo celično linijo je znano, da je gen z vrsto celičnih manipulacij (mutageneza z obsevanjem itd.) med svojim nastankom izgubila (Urlaub in Chasin, 1980; Urlaub in sod., 1983). Visoko izražanje *hDHFR* pri CHO der1 in CHO der2 se ujema s tem, da imata le ti dve liniji nepoškodovana oba alela za omenjeni gen. Celični liniji CHO der3 in CHO der4 oz. njena predhodnica CHO-DUX11 je bila podobno kot CHO-DG44 pri CHO der6 v svojem procesu nastanka podvržena procesu mutageneze z namenom izbitja alelov za *hDHFR* (Urlaub in Chasin, 1980; Urlaub in sod., 1983). V tem primeru jim je uspelo onespособiti le en alel *rDHFR* (Gandor in sod., 1995; Wurm, 2013). Prisotnost le enega alela *rDHFR* je lahko razlog za znižano izražanje gena pri CHO der3 in CHO der4 v primerjavi s CHO der1 in CHO der2.

Pri *rDHFR* smo opazili variabilno izražanje pri G418 klonih pri celičnih linijah CHO der1, der2 in der4, medtem ko ima pri celičnih linijah CHO der3 in der6 konstantno povišano

izražanje (slika 23). Glede na to, da ima tudi starševska celična linija CHO der3 med drugim najvišje izražanje *rDHFR* v primerjavi z vsemi preostalimi starševskimi celičnimi linijami, je možno, da je pri tej liniji prišlo do nespecifične vezave na *hDHFR*. Endogeni *hDHFR* se je lahko pri CHO der3 znotraj svojega razvoja tako spremenil, da so se že tako majhne razlike v nukleotidnem zaporedju med *hDHFR* in *rDHFR* še zmanjšale. Lahko pa za povišano izražanje *hDHFR* pri CHO der3 obstaja še drugi, trenutno neznani razlog. Pri celični liniji CHO der6 bi povišano izražanje *rDHFR* pri vseh klonih ne glede na selekcijski pritisk lahko razložili s tem, da je to edina celična linija, ki endogenega *hDHFR* nima, kar pomeni, da za svojo rast potrebuje tudi prisotnost nukleotidov v gojišču. Te se za bolj učinkovito selekcijo z G418 ali MTX, v obeh selekcijskih korakih iz gojišča odvzame in celice so za preživetje primorane spremeniti svojo metabolno pot v smer aktivacije gena *rDHFR* (tudi pri G418 klonih).

Da je izražanje *rDHFR* (in tudi *hDHFR*, razen seveda pri CHO der6, ki tega v svojem genomu nima) pri MTX klonih za vse celične linije povišano, je dokaj pričakovano, saj se MTX kompetitivno veže na encim DHFR in ga z vezavo inhibira, kar lahko vodi v celično smrt. DHFR katalizira pretvorbo dihidrofolata v tertahidrofolat, ki je nujen za sintezo purinov in timidilata ter posledično pomemben za rast in delitev celic. MTX ima 100 x višjo afiniteto za DHFR, kot ga imajo folati (Goodsell, 1999; Rajagopalan in sod., 2002). Celicam, ki so izpostavljene velikim koncentracijam MTX, tako za preživetje ne preostane drugega, kot da zvišajo izražanje *DHFR*, kar pojasni rezultat, da imajo vsi kloni MTX ne glede na celično linijo povišano izražanje tega gena.

Ker mikromreže omogočajo spremljanje izražanja več genov hkrati, smo primerjali tudi povezavo med izražanjem selekcijskih genov in transgenov. Opazili smo, da imajo G418 kloni lahko okvarjena gena za lahko in/ali težko verigo IgG in jim manjka tudi *rDHFR* ter bodo preživeli selekcijo z antibiotikom, ker imajo najverjetneje prisoten zapis za gen *Neo*. Po drugi strani za MTX klone velja, da imajo lahko okvarjeno izražanje IgG, vendar imajo vsi aktivno izražanje *rDHFR*, saj drugače ne bi preživeli selekcije z MTX. Ker je zapis za lahko verigo bližje *rDHFR* kot za težko verigo, je to najverjetneje razlog, da imajo MTX kloni navadno okvarjen le gen za težko verigo.

5.1.7 Vpliv selekcijskih učinkovin (G418, MTX) na izražanje genov

Ker sta selekcijski učinkovini G418 in MTX glavni komponenti v gojišču pri producirajočih celičnih linijah oz. klonih, pri katerih nas je zanimal predvsem vpliv visoke in nizke produktivnosti na izražanje genov, in bi lahko vplivali na omenjeno, smo primerjalno analizirali tudi transkriptom celic, ki so bile selekcionirane z G418 ali MTX.

Pri primerjavi G418 klonov z MTX kloni za vse celične linije hkrati so se kot najvišje uvrščeni različno izraženi geni pokazali gen za *rDHFR* in gena za lahko in težko verigo IgG. Izražanje gena *rDHFR* je, kot že omenjeno, pričakovano povišano pri MTX klonih, saj na principu amplifikacije temelji selekcijski sistem DHFR – MTX. Vzrok za povišano

izražanje genov za lahko in težko verigo pri MTX klonih je lahko v tem, da amplifikacijska enota sistema DHFR – MTX ne zajema le gena *rDHFR*, ampak tudi 100–3000 kb v neposredni bližini *rDHFR* (Kaufman, 1990; Kaufman in sod., 1983). Dodaten razlog za povišano izražanje genov za lahko in težko verigo pri MTX klonih se lahko skriva tudi v dejstvu, da so G418 kloni pogostejše nizki producenti v primerjavi z MTX kloni. Zaradi zadnjega se seznama različno izraženih genov, ki so značilni za visoke producente (oz. nizke producente) ter MTX klone (oz. G418 klone), posledično prekrivata.

Preostali geni, prepoznani kot višje izraženi pri MTX klonih (preglednica 33 in slika 25) pri analizi, ki je bila izvedena za vse celične linije hkrati, imajo znotraj posamezne skupine visoko variabilnost v izražanju, kar je otežilo izbiro določenih genov za potrjevanje s qPCR. Odločili smo se za gen *Slc17a6*, ker ima povišano izražanje pri MTX klonih pri večini celičnih linij. Trend izražanja smo potrdili pri vseh celičnih linijah, razen pri CHO der1 (slika 37).

Slc17a6 ali gen, ki kodira vezikularni glutamatni transporter (angl. solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6 Gene) pri človeku, skrbi za vnos glutamata v sinaptične vezikle. Pri celicah CHO funkcija gena ni pojasnjena, je pa najverjetneje povezana s prevzemom glutamata v celice. Vse analizirane celične linije CHO imajo namreč v gojišče dodan glutamin, ki se z glutaminazami pretvarja v glutamat, ki je najpogostejša intracelularna aminokislina, odgovorna za številne metabolne funkcije (pretvori se lahko v gama butirično kislino, ornitin, 2-oksoglutarat, glukozo ali glutation) (Newsholme in sod., 2003). Glutamat v celice vstopi z glutamatnimi transporterji, kamor se uvršča tudi protein, ki ga kodira gen *Slc17a6*. Kakšno povezavo ima to z MTX, trenutno ni jasno, lahko pa vpliva na druge ugodne lastnosti celic, gojene v kulturi. Omenjeni gen je bil pozitivno povezan tudi z visoko produktivnostjo.

5.1.8 Identifikacija označevalnih genov za visoko produktivnost

Poleg iskanja genetskih označevalcev za namen genetskih modifikacij v pomenu oblikovanja ustrezne oz. visoko produktivne celične linije nas je na začetku poskusa zanimala tudi povezava med prepisovanjem transkripta za oba transgena in produktivnostjo.

Številne študije se v svojih sklepih razlikujejo – nekateri poročajo o odsotnosti korelacije med izražanjem gena za lahko in težko verigo IgG (Flickinger in sod., 1992; Leno in sod., 1992; Reisinger in sod., 2008; Smales in sod., 2004), drugi, da je korelacija prisotna le med izražanjem enega izmed genov za lahko ali težko verigo in produktivnostjo (Borth in sod., 1999; Dorai in sod., 2006; Lee in sod., 2009; McLeod in sod., 2011; Merten in sod., 1994; Strutzenberger in sod., 1999; Vishwanathan in sod., 2014). Pri svoji študiji smo opazili pozitivno korelacijo v obeh primerih med lahko in tudi težko verigo in produktivnostjo (slika 28). Čeprav je korelacija srednje močna, je na prvi pogled videti, da je pri visokih producentih izražanje transgenov visoko in obratno pri nizkih producentih (slika 27). To je

skladno z ugotovitvami, da ima pri visokih producentih zelo pomembno vlogo dobro vzpostavljen izločevalni sistem (Kantardjieff in sod., 2010; O'Callaghan in sod., 2010; Peng in sod., 2011; Peng in sod., 2010; Yee in sod., 2009). Lahko pa gre tudi za mehanizem povratnih zank, ko se pri nizkih producentih zaradi različnih metabolnih (morda tudi sekretornih) omejitev zniža izražanje transgenov, saj bi bilo intracelularno kopičenje teh za celico najverjetneje toksično in usodno.

V številnih študijah so opazili tudi, da je razmerje med lahko in težko verige IgG običajno v prid lahke verige in večje od 1 – pri transkriptu in proteinu (Bibila in Flickinger, 1991; Edros in sod., 2013; Li in sod., 2007; O'Callaghan in sod., 2010; Schlatter in sod., 2005; Vishwanathan in sod., 2014). Pri naši analizi tega nismo opazili, je pa res, da so na voljo podatki o razmerju med lahko in težko verigo izražanja IgG pridobljeni le z mikromrežami, kar morda ne izraža realnega stanja v celicah zaradi ozkega linearnega območja kvantifikacije. Za pravilne zaključke bi morali izražanje preveriti še s qPCR.

Podobno kot pri primerjavi G418 in MTX klonov, smo tudi pri visokih in nizkih producentih primerjali izražanje genov v teh dveh skupinah, naprej za vse celične linije hkrati. Z značilno povišanim izražanjem pri visoko producirajočih klonih so se ponovno pokazali gen *rDHFR* in gena za lahko in težko verigo, kar je bilo pričakovano, med preostalimi pa je izstopal gen *Ncln*. Le za zadnjega je bilo izražanje v posamezni skupini enakomerno zvišano/znižano, zato smo se ga tudi odločili izbrati za potrjevanje z metodo qPCR. Rezultati se med metodama žal niso ujemali, kar nakazuje na to, da gre verjetno za napako oz. nespecifičnost seta sond na mikromrežah. V podporo takemu sklepu je tudi ugotovitev, da je na mikromrežah za gen *Ncln* več setov sond, različno izražanje med visoko in nizko producirajočimi kloni pa smo identificirali le pri enem izmed setov. Točnost rezultatov qPCR smo preverili tudi s tremi različno zasnovanimi kompleti začetnih oligonukleotidnih in sond.

Izmed preostalih diferencialno izraženih genov (*Oat*, *AC126552.5*, *Hoxa9*, *Cgntl1*, *Ces2g*, *AJ297131.1*, *Slc17a6* in *GH536603.1*) v analizi vseh linij hkrati bi lahko bila potencialno zanimiva še vsaj gena *AJ297131.1* in *GH536603.1*. Ta dva namreč kažeta popolno odsotnost izražanja pri nekaterih klonih, medtem ko je pri vseh preostalih naštetih klonih izražanje znotraj skupine zelo variabilno. Taki geni so precej zapleteni za potrjevanje izražanja s qPCR. Eden izmed razlogov za to so lahko razlike v izražanju med posameznimi celičnimi linijami in v zastopanosti klonov v določeni skupini. Na primer, če je en gen značilen le za določeno celično linijo CHO der in je klonov iz te linije številčno več v določeni skupini nizko/visoko producirajočih klonov, lahko to pomembno vpliva na rezultat analize. Gen *Slc17a6* in tudi številni drugi se pojavijo v primerjavi G418 klonov z MTX kloni, kot tudi pri primerjavi visoko in nizko producirajočih klonov. Za te gene velja, da če imajo povišano izražanje pri MTX klonih, ga imajo tudi pri visokih producentih. Podobno velja tudi za G418 klone in nizko producirajoče klone. Razlog za to je v tem, da so v povprečju, razen nekaj izjem, G418 kloni nižji producenti kot MTX kloni, pri katerih sta povišano izražanje transgenov in tudi produktivnost lahko posledica amplifikacije.

Geni, ki se pojavijo kot značilno izraženi v obeh primerjavah, so lahko genetski označevalci za produktivnost, ali pa vpliva na njihovo zvišano/znižano izražanje MTX.

Zaradi bistvene razlike v ekspresijskih profilih med posameznimi celičnimi linijami CHO (sliki 18 in 30) in tudi zaradi razmeroma majhnega števila različno izraženih genov v primerjavi visoko in nizko producirajočih klonov prek vseh celičnih linij smo skupini različno producirajočih klonov primerjali tudi znotraj posamezne celične linije. V tem primeru je bilo različno izraženih genov med obema skupinama precej več. Za potrjevanje s qPCR smo izbrali 7 genov, ki imajo značilno povišano/znižano izražanje za posamezno celično linijo ali pri večjih linijah. Izražanje se je med obema metodama za analizo izražanja ujemalo za vse izbrane gene, razen za enega (*AC130203*). Verjetno so razlogi za to enaki kot pri genu *Ncln*.

Izmed izbranih genov za potrjevanje izražanja s qPCR je 6 takih (*AC124993.19*, *AC121849.3*, *Runx2*, *Fkbp10*, *Dkk3* in *Rarres2*), ki zagotovo predstavljajo označevalce za visoko produktivnost. Resda smo pri teh izražanje validirali z dvema metodama, je pa potencialnih označevalcev še veliko in so zbrani v preglednicah od 39 do 45.

Biološka interpretacija zaznanih sprememb v izražanju genov pri celicah CHO je težavna, saj je podatkov, kakšen vpliv naj bi imelo njihovo povišano/znižano izražanje na celične linije, zelo malo. Dva izmed genov (*AC124993.19* in *AC121849.3*) nista anotirana, za preostale *Runx2*, *Dkk3* in *Rarres2* prav tako nismo našli ustrezne biološke interpretacije, zakaj so prav ti odgovorni za produktivnost. Protein, ki ga kodira gen *Fkbp10*, se uvršča med skupino šaperoninov, ki skrbijo za pravilno zvitje proteinov, lahko pa tudi označuje nepravilno zvite proteine.

Nekateri identificirani geni so zagotovo edinstveni in prvič identificirani v povezavi s produktivnostjo v tej študiji, medtem ko je druge (npr. *Rarres2*) s produktivnostjo že uspelo povezati nekaterim drugim avtorjem (Kantardjieff in sod., 2010). Na splošno pa velja, da je, ker so bile analize transkriptoma izvedene na mikromrežah, ki so bile izdelane po naročilu in jih praktično v literaturi ni mogoče zaslediti, precej verjetno, da je kar nekaj genov, ki smo jih zaznali kot potencialne označevalce, omenjenih prvič.

Na splošno smo v analizi produktivnosti zaznali večje število genov z razmeroma nizkimi razlikami v izražanju med skupinami. Kljub identifikaciji zajetnega števila genov, ki bi lahko predstavljali genetske označevalce za produktivnost, na pogosto vprašanje, ali je hiperproduktivnost posledica manjših sprememb v izražanju večjega števila genov ali velikih sprememb manjšega števila genov (Charaniya in sod., 2008; Seth in sod., 2007), še ne moremo z zagotovostjo odgovoriti.

V trenutnem procesu izbora klonov znotraj razvoja končne rekombinantne celične linije za proizvodnjo biološko podobnih zdravil smo omejeni na pregled razmeroma majhnega števila klonov (pribl. 100–200). Zaradi tega visoko ali še boljše rečeno hiperproduktivne

klone velikokrat zgrešimo oz. ne zajamemo v izbor. Prav zato postajajo genetski označevalci za visoko produktivnost tako pomembni, saj omogočajo potencialne izboljšave presejanja klonov na produktivnost in tudi potencialne izboljšave starševskih celičnih linij.

Vseh 6 omenjenih genov in tudi drugi, ki jih še nismo validirali z metodo qPCR, so kandidati za razvoj metode (na podlagi qPCR), s katero bi na podlagi njihovega izražanja presejali večje število vzorcev (npr. 1000) v majhnem volumnu in že zelo zgodaj v razvoju rekombinantnih celičnih linij (na ravni mikrotitrskih ploščic).

Identificirani označevalci za produktivnost so tudi kandidati za izboljšanje celičnih linij, predvsem starševskih, ki so izhodni material za razvoj rekombinantnih končnih produkcijskih klonov. S tehnologijami celičnega inženiringa (npr. izbijanje genov z nukleazami ZFN, tehnologijo Talen, CRISPR-Cas itd.) bi gene z znižanim izražanjem pri visokih producentih pri starševski celični liniji lahko onesposobili in tako ustvarili celično linijo z večjim potencialom za visoko produktivnost. Po drugi strani, bi pri starševski celični liniji lahko s transfekcijo vnesli dodatne kopije gena v genom in s tem povečali izražanje genov, ki so imeli povišano izražanje pri visokih producentih. Z enim ali drugim pristopom bi bilo mogoče ustvariti izboljšane starševske celične linije, ki bi producirale večje število visoko producirajočih klonov. S tem bi tudi zmanjšali potrebo bo presejanju ogromnega števila klonov znotraj razvoja rekombinantnih celičnih linij.

5.2 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil poglobiti razumevanje transkriptoma starševskih in tudi producirajočih celičnih linij, ki se uporabljajo v razvoju rekombinantnih celičnih linij za produkcijo biološko podobnih zdravil.

Ugotovili smo, da različne celične linije CHO lahko ločujemo glede na njihov ekspresijski profil, in v ta namen identificirali edinstvene gene, ki omogočajo ločevanje med analiziranimi celičnimi linijami. Označevalne gene lahko uporabimo za ločevanje starševskih in tudi različnih producirajočih rekombinantnih celičnih linij, ki izvirajo iz iste starševske celične linije. Z mikromrežami smo skupaj zaznali približno 160 edinstvenih označevalnih genov, specifičnost njihovega izražanja pa potrdili na izbranih 11 genih.

Različni kloni so glede na celostno izražanje genov bolj podobni starševskim celičnim linijam, iz katerih izvirajo, kot pa klonom s podobnimi rastnimi ali produkcijskimi sposobnostmi.

Za celično linijo CHO der6, ki je najnižje producirajoča celična linija, smo s funkcionalno analizo s programom GSEA ugotovili, da je vzrok za to najverjetneje v povišanem izražanju skupin genov, ki so lahko povezane s tvorbo celičnih skupkov, in znižano izražanje skupin genov, ki so vključene v aktivno rast celic.

V analizi izražanja hrčkovega gena *hDHFR* smo ugotovili, da raven njegovega izražanja sovпада z zgodovino nastanka celičnih linij. Najvišje izražanje imata celični liniji (CHO der1 in CHO der2) z dvema intaktnima aleloma *rDHFR*, sledita celični liniji (CHO der3 in CHO der4), ki imata kot posledico mutageneze okvarjen en alel gena, medtem ko ima CHO der6 izbita oba alela in posledično tudi odsotno izražanje. Rekombinatni *DHFR* je imel povišano izražanje pri visoko producirajočih klonih.

Izražanje gena za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa (IgG) v naši študiji pozitivno korelira s produktivnostjo.

Zaradi okvare ekspresijskega vektorja B smo tega izločili iz študije. Dodatno smo zaključili, da je verjetnost, da bi razvoj rekombinantnih celičnih linij potekal z manjšim številom vektorjev in tudi celičnih linij, majhna, saj je na začetku razvoja ključnega pomena čim večja variabilnost.

S kombinacijo analize transkriptoma klonov, selekcioniranih z G418 ali MTX, ter visoko in nizko producirajočih klonov smo identificirali označevalne gene za visoko produktivnost. Večje število genov smo zaznali z mikromrežami, pri šestih smo izražanje potrdili tudi z metodo qPCR. Identificirani geni, povezani s produktivnostjo, so pomembni kandidati za razvoj orodja, temelječega na metodi qPCR, za presejanje večjega števila klonov zgodaj v razvoju rekombinantnih celičnih linij in tudi pomembni kandidati za izboljšanje starševskih celičnih linij z metodami celičnega inženiringa.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Celične linije ovarija kitajskega hrčka (CHO) so najpogostejše uporabljeni sistem za proizvodnjo farmacevtskih terapevtikov. Razvoj biološko podobnih zdravil, ki so večinoma monoklonska protitelesa iz skupine imunoglobulinov G, se začne s transfekcijo ekspresijskega vektorja v različne starševske celične linije CHO. Sledijo selekcija celic, ki so uspešno vgradile zapis za rekombinantni protein v genom, kloniranje, ovrednotenje klonov glede na njihove rastne lastnosti in produktivnost, stabilnost produkcije, ustreznost razvoja v bioreaktorjih in kakovost produkta. Končna produkcijska celična linija, shranjena v obliki celičnih bank (MCB in WCB), se nato uporabi za pripravo materiala za klinične študije in za nadaljnjo proizvodnjo produkta. Izbor končne produkcijske celične linije je velikokrat odvisen od produkcijskega potenciala končnega klona in tudi genetske zasnove starševske celične linije, iz katere izvira.

Namen doktorskega dela je bil poglobiti razumevanje celostnega izražanja genov starševskih celičnih linij in različno producirajočih celičnih linij. Želeli smo ugotoviti bistvene razlike med posameznimi starševskimi celičnimi linijami. Pri primerjavi visoko in nizko producirajočih celičnih linij smo želeli identificirati potencialne označevalne gene, ki so odgovorni za visoko produktivnost končnih produkcijskih celičnih linij. Celostno izražanje genov smo proučevali s tehnologijo mikromrež, izražanje izbranih genov pa potrdili tudi z metodo qPCR. Analizo starševskih celičnih linij smo dodatno podkrepili s proučevanjem kariotipov.

Analiza kariotipov starševskih celičnih linij z barvanjem po Giemsi delno omogoča ločevanje med posameznimi celičnimi linijami. Zaradi nestabilne narave kromosomov (kromosomske prerazporeditve) celičnih linij CHO, ki so pogosto posledica nastanka starševskih in tudi producirajočih celičnih linij, je kariotipizacija premalo zanesljiva metoda za natančno ločevanje med njimi. Z analizo transkriptoma neproducirajočih celičnih linij smo ugotovili, da različne celične linije CHO lahko zanesljivo ločujemo glede na njihov ekspresijski profil. Ugotovili smo tudi, da so različni kloni glede na celostno izražanje genov bolj podobni starševskim celičnim linijam, iz katerih izvirajo, kot pa klonom s podobnimi rastnimi ali produkcijskimi sposobnostmi. Dokazali smo, da je podobnost transkripcijskih profilov odvisna od zgodovine nastanka starševskih celičnih linij, vendar neodvisna od manipulacijskih korakov (kot kloniranje, selekcije z različnimi selekcijskimi agenti itd.), ki so značilni za razvoj rekombinantnih celičnih linij.

Pri primerjavi različnih parov starševskih celičnih linij in tudi določenih starševskih celičnih linij z vsemi preostalimi smo z mikromrežami zaznali 160 edinstvenih označevalnih genov, specifičnost njihovega izražanja pa z metodo qPCR potrdili na izbranih 11 genih. Teh 11 edinstvenih genov omogoča ločevanje med analiziranimi celičnimi linijami. Označevalne gene lahko uporabimo za ločevanje starševskih in tudi

različnih producirajočih rekombinantnih celičnih linij, ki izvirajo iz iste starševske celične linije. Ker se proces razvoja rekombinantne celične linije začne z več starševskimi celičnimi linijami, je tovrstna identifikacija na podlagi izražanja genov pomembno orodje za zagotavljanje čedalje večjih zahtev po vzdrževanju visokih ravni kakovosti v laboratorijih farmacevtske industrije.

Pri proučevanju transkriptoma producirajočih celičnih linij smo se osredotočili na izražanje selekcijskih genov (*DHFR*) in genov za rekombinantni protein (gena za lahko in težko verigo mAb) ter predvsem na analizo transkriptoma visoko in nizko producirajočih klonov v kombinaciji z analizo transkriptoma klonov na različnih selekcijskih stopnjah (G418 ali MTX). V analizi izražanja hrčkovega gena *hDHFR* smo ugotovili, da raven njegovega izražanja sovпада z zgodovino nastanka celičnih linij, medtem ko smo za rekombinantni gen *DHFR* (*rDHFR*), ki smo ga v celice vnesli z ekspresijskim vektorjem, potrdili povišano izražanje pri visoko producirajočih klonih. Izražanje gena za lahko in težko verigo mAb v naši študiji pozitivno korelira s produktivnostjo, medtem ko število kopij transgenov ni povezano z visoko produktivnostjo.

Z mikromrežami smo uspešno identificirali tudi večje število označevalnih genov za visoko produktivnost, pri šestih smo izražanje potrdili tudi z metodo qPCR. Manjše število označevalnih genov je značilnih za več kot eno celično linijo, pri več od njih smo potrdili, da so označevalni geni za produktivnost za določeno celično linijo. Identificirani označevalni geni so kandidati za razvoj orodja, temelječega na metodi qPCR, za presejanje večjega števila klonov zgodaj v razvoju rekombinantnih celičnih linij in tudi pomembni kandidati za izboljšanje starševskih celičnih linij z metodami celičnega inženiringa.

6.2 SUMMARY

Chinese hamster ovary (CHO) cell lines are the most widely used mammalian cell type for the production of recombinant therapeutic proteins. The cell line development for biosimilar production, which are mostly monoclonal antibodies (immunoglobulin G), begins with transfection of the expression vector into various CHO parental cell lines. The next steps are the selection of cells that have successfully integrated genes for recombinant protein in their genome, cloning, evaluation of clones based on their cell culture performance (growth and productivity), stability of production, potency of development in bioreactors, and product quality. The final production cell line is stored as cell banks (MCB and WCB) which are subsequently used to prepare material for clinical studies and for further production of the product. Selection of the final production cell line is often dependent on productivity potential of the final clone, as well as on the genetic variability among CHO cell lines.

The main aim of the doctoral thesis was to broaden the knowledge of the whole gene expression of parental cell lines and different producing cell lines used in the biosimilar cell line development process. One of the goals was to identify the main differences between the parental cell lines and the potential marker genes that are responsible for the high productivity of the recombinant cell lines. A comprehensive gene expression study was carried out using microarray technology and the qPCR method for gene expression confirmation. The characterization of the parental cell lines was additionally supported by the karyotype analysis.

The karyotype analysis based on Giemsa staining partially enables the separation between individual CHO cell lines. The analysed cell lines differ in their karyotype, but due to the inherent genome instability (chromosome rearrangements) of the CHO cell lines observed during parental and recombinant cell-line establishment, karyotyping is not the preferred method for accurate identification of various CHO cell lines. We demonstrated that similarity of overall transcriptional profiles is dependent on the cell line history but independent of the manipulation steps involved in the recombinant cell-line development process, such as cloning and selection with different selection agents.

With a microarray-based transcriptome comparison of different parental cell lines we detected 160 marker genes that uniquely determine specific cell lines. The specificity of gene expression was confirmed by the qPCR method for 11 selected genes. These 11 marker genes with a unique transcription profile for specific CHO cell lines can provide new means for identification of the origin of a cell line undergoing development in research laboratories. As the development process of each recombinant cell line usually starts with various CHO cell lines, the identification of this specific cell line through its specific expression profile represents a powerful tool to ensure the maintenance of high quality standards in laboratories of the pharmaceutical industry.

Within the transcriptome analysis of producing cell lines we focused on the analysis of the transcriptome of high- and low producing clones in combination with the transcriptome analysis of clones in different selection steps (geneticin or methotrexate). In addition, we focused on the expression of the dihydrofolate reductase (*DHFR*) gene and genes for the light and heavy chain of the recombinant protein. The gene expression analysis of the hamster *DHFR* gene (*hDHFR*) indicated that the level of its expression correlates well with the history of the cell lines, while the recombinant *DHFR* gene (*rDHFR*), which was introduced into the cells with the expression vector, showed increased expression in high producing clones. Expression of the gene for the light and heavy chain was positively correlated with productivity while the number of copies of transgenes was not associated with high productivity.

The microarrays also served as a tool for successful identification of a large number of marker genes associated with high productivity and for six of them we confirmed the expression also with the qPCR method. A smaller number of marker genes are specific for more than one cell line, while several other genes were identified as marker genes for productivity for a specific cell line. The identified marker genes represent candidates for the development of a qPCR-based tool for the screening of a large number of clones early in the development of recombinant cell lines, as well as potential candidates for improvement of parental cell lines using cell engineering methods.

7 VIRI

- Baik J.Y., Lee M.S., An S.R., Yoon S.K., Joo E.J., Kim Y.H., Park H.W., Lee G.M. 2006. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 2: 361-371
- Baker K.E., Parker R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 3: 293-299
- Baldi L., Muller N., Picasso S., Jacquet R., Girard P., Thanh H.P., Derow E., Wurm F.M. 2005. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress*, 21, 1: 148-153
- Barnes L.M., Bentley C.M., Dickson A.J. 2001. Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 4: 261-270
- Barnes L.M., Bentley C.M., Dickson A.J. 2004. Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 2: 115-121
- Barron N., Kumar N., Sanchez N., Doolan P., Clarke C., Meleady P., O'Sullivan F., Clynes M. 2011. Engineering CHO cell growth and recombinant protein productivity by overexpression of miR-7. *Journal of Biotechnology*, 151, 2: 204-211
- Bebbington C.R., Renner G., Thomson S., King D., Abrams D., Yarranton G.T. 1992. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Bio/Technology*, 10, 2: 169-175
- Becker J., Hackl M., Rupp O., Jakobi T., Schneider J., Szczepanowski R., Bekel T., Borth N., Goesmann A., Grillari J., Kaltschmidt C., Noll T., Puhler A., Tauch A., Brinkrolf K. 2011. Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *Journal of Biotechnology*, 156, 3: 227-235
- Becker J., Timmermann C., Rupp O., Albaum S.P., Brinkrolf K., Goesmann A., Puhler A., Tauch A., Noll T. 2014. Transcriptome analyses of CHO cells with the next-generation microarray CHO41K: development and validation by analysing the influence of the growth stimulating substance IGF-1 substitute LongR(3.). *Journal of Biotechnology*, 178: 23-31
- Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125, 1-2: 279-284
- Bibila T.A., Flickinger M.C. 1991. A model of interorganelle monoclonal antibody transport and secretion in mouse hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 7: 767-280

- Bickmore W.A. 2001. Karyotype analysis and chromosome banding. V: Encyclopedia of life sciences. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: doi: 10.1038/npg.els.0001160: 7 str. <http://www.unioviado.es/esr/pp/bandmethods.pdf> (oktober 2014)
- Birch J.R., Racher A.J. 2006. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 5-6: 671-685
- Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M., Speed T.P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, 2: 185-193
- Borth N., Strutzenberger K., Kunert R., Steinfellner W., Katinger H. 1999. Analysis of changes during subclone development and ageing of human antibody-producing heterohybridoma cells by northern blot and flow cytometry. *Journal of Biotechnology*, 67, 1: 57-66
- Brinkrolf K., Rupp O., Laux H., Kollin F., Ernst W., Linke B., Kofler R., Romand S., Hesse F., Budach W.E., Galosy S., Muller D., Noll T., Wienberg J., Jostock T., Leonard M., Grillari J., Tauch A., Goesmann A., Helk B., Mott J.E., Puhler A., Borth N. 2013. Chinese hamster genome sequenced from sorted chromosomes. *Nature Biotechnology*, 31, 8: 694-695
- Cacciatore J.J., Chasin L.A., Leonard E.F. 2010. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology Advances*, 28, 6: 673-681
- Cao Y., Kimura S., Itoi T., Honda K., Ohtake H., Omasa T. 2012. Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 6: 1357-1367
- Charaniya S., Hu W.S., Karypis G. 2008. Mining bioprocess data: opportunities and challenges. *Trends in Biotechnology*, 26, 12: 690-699
- Chusainow J., Yang Y.S., Yeo J.H., Toh P.C., Asvadi P., Wong N.S., Yap M.G. 2009. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 4: 1182-1196
- Clarke C., Doolan P., Barron N., Meleady P., O'Sullivan F., Gammell P., Melville M., Leonard M., Clynes M. 2011a. Large scale microarray profiling and coexpression network analysis of CHO cells identifies transcriptional modules associated with growth and productivity. *Journal of Biotechnology*, 155, 3: 350-359
- Clarke C., Doolan P., Barron N., Meleady P., O'Sullivan F., Gammell P., Melville M., Leonard M., Clynes M. 2011b. Predicting cell-specific productivity from CHO gene expression. *Journal of Biotechnology*, 151, 2: 159-165
- Cost G.J., Freyvert Y., Vafiadis A., Santiago Y., Miller J.C., Rebar E., Collingwood T.N., Snowden A., Gregory P.D. 2010. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases

- yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 2: 330-340
- Dalma-Weiszhausz D.D., Warrington J., Tanimoto E.Y., Miyada C.G. 2006. The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods in Enzymology*, 410: 3-28
- Danckwardt S., Neu-Yilik G., Thermann R., Frede U., Hentze M.W., Kulozik A.E. 2002. Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood*, 99, 5: 1811-1816
- Datta P., Linhardt R.J., Sharfstein S.T. 2013. An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 5: 1255-1271
- Deaven L.L., Petersen D.F. 1973. The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma*, 41, 2: 129-144
- Derouazi M., Martinet D., Besuchet Schmutz N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D.L., Beckmann J.S., Wurm F.M. 2006. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 4: 1069-1077
- Doležal J. 2009. Razvoj postopka kvantitativnega PCR v realnem času za določanje ravni izražanja nekaterih genov v celični liniji CHO-K1. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za Biokemijo: 65 str.
- Doolan P., Barron N., Kinsella P., Clarke C., Meleady P., O'Sullivan F., Melville M., Leonard M., Clynes M. 2012. Microarray expression profiling identifies genes regulating sustained cell specific productivity (S-Qp) in CHO K1 production cell lines. *Biotechnology Journal*, 7, 4: 516-526
- Doolan P., Meleady P., Barron N., Henry M., Gallagher R., Gammell P., Melville M., Sinacore M., McCarthy K., Leonard M., Charlebois T., Clynes M. 2010. Microarray and proteomics expression profiling identifies several candidates, including the valosin-containing protein (VCP), involved in regulating high cellular growth rate in production CHO cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 1: 42-56
- Doolan P., Melville M., Gammell P., Sinacore M., Meleady P., McCarthy K., Francullo L., Leonard M., Charlebois T., Clynes M. 2008. Transcriptional profiling of gene expression changes in a PACE-transfected CHO DUKX cell line secreting high levels of rhBMP-2. *Molecular Biotechnology*, 39, 3: 187-199
- Dorai H., Corisdeo S., Ellis D., Kinney C., Chomo M., Hawley-Nelson P., Moore G., Betenbaugh M.J., Ganguly S. 2012. Early prediction of instability of Chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 4: 1016-1030

- Dorai H., Csirke B., Scallon B., Ganguly S. 2006. Correlation of heavy and light chain mRNA copy numbers to antibody productivity in mouse myeloma production cell lines. *Hybridoma (Larchmt)*, 25, 1: 1-9
- Dorai H., Ellis D., Keung Y.S., Campbell M., Zhuang M., Lin C., Betenbaugh M.J. 2010. Combining high-throughput screening of caspase activity with anti-apoptosis genes for development of robust CHO production cell lines. *Biotechnology Progress*, 26, 5: 1367-1381
- Dorai H., Kyung Y.S., Ellis D., Kinney C., Lin C., Jan D., Moore G., Betenbaugh M.J. 2009. Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 3: 592-608
- Edros R.Z., McDonnell S., Al-Rubeai M. 2013. Using molecular markers to characterize productivity in Chinese hamster ovary cell lines. *PloS One*, 8, 10: e75935, doi: 10.1371/journal.pone.0075935: 13 str.
- ENSEMBL. 2014. Chromosome 13: 92,350,696-92,384,966. Cambridge, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Sanger Institute. http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?g=ENSMUSG00000021707;r=13:92350696-92384966;t=ENSMUST00000022218 (september 2014)
- Exposito-Rodriguez M., Borges A.A., Borges-Perez A., Perez J.A. 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8: 131, doi: 10.1186/1471-2229-8-131: 12 str.
- Fann C.H., Guarna M.M., Kilburn D.G., Piret J.M. 1999. Relationship between recombinant activated protein C secretion rates and mRNA levels in baby hamster kidney cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 4: 464-472
- Fleischer B. 2004. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Tropical Medicine and International Health*, 9, 7, doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01278.x: 7 str.
- Flickinger M.C., Goebel N.K., Bibila T., Boyce-Jacino S. 1992. Evidence for posttranscriptional stimulation of monoclonal antibody secretion by L-glutamine during slow hybridoma growth. *Journal of Biotechnology*, 22, 3: 201-226
- Flintoff W.F., Davidson S.V., Siminovitch L. 1976. Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genetics*, 2, 3: 245-261
- Gaj T., Guo J., Kato Y., Sirk S.J., Barbas C.F., 3rd. 2012. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nature Methods*, 9, 8: 805-807
- Gammell P., Barron N., Kumar N., Clynes M. 2007. Initial identification of low temperature and culture stage induction of miRNA expression in suspension CHO-K1 cells. *Journal of Biotechnology*, 130, 3: 213-218

- Gandor C., Leist C., Fiechter A., Asselbergs F.A. 1995. Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells. *FEBS Letters*, 377, 3: 290-294
- Gatti M.D., Wlaschin K.F., Nissom P.M., Yap M., Hu W.S. 2007. Comparative transcriptional analysis of mouse hybridoma and recombinant Chinese hamster ovary cells undergoing butyrate treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 1: 82-91
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6, 10: 995-1001
- Goler-Baron V., Selitrennik M., Barkai O., Haimovich G., Lotan R., Choder M. 2008. Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes and Development*, 22, 15: 2022-2027
- Goodsell D.S. 1999. The molecular perspective: methotrexate. *Stem Cells*, 17, 5: 314-315
- Graf L.H., Jr., Chasin L.A. 1982. Direct demonstration of genetic alterations at the dihydrofolate reductase locus after gamma irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, 2, 1: 93-96
- Griffin T.J., Seth G., Xie H., Bandhakavi S., Hu W.S. 2007. Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. *Trends in Biotechnology*, 25, 9: 401-408
- GSEA. 2014. GSEA software. Cambridge, Broad Institute. <http://www.broadinstitute.org/gsea> (september 2014)
- Gustafsson C., Minshull J., Govindarajan S., Ness J., Villalobos A., Welch M. 2012. Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expression and Purification*, 83, 1: 37-46
- Hackl M., Jadhav V., Jakobi T., Rupp O., Brinkrolf K., Goesmann A., Puhler A., Noll T., Borth N., Grillari J. 2012. Computational identification of microRNA gene loci and precursor microRNA sequences in CHO cell lines. *Journal of Biotechnology*, 158, 3: 151-155
- Hackl M., Jakobi T., Blom J., Doppmeier D., Brinkrolf K., Szczepanowski R., Bernhart S.H., Honer Zu Siederdisen C., Bort J.A., Wieser M., Kunert R., Jeffs S., Hofacker I.L., Goesmann A., Puhler A., Borth N., Grillari J. 2011. Next-generation sequencing of the Chinese hamster ovary microRNA transcriptome: Identification, annotation and profiling of microRNAs as targets for cellular engineering. *Journal of Biotechnology*, 153, 1-2: 62-75
- Hammond S., Swanberg J.C., Kaplarevic M., Lee K.H. 2011. Genomic sequencing and analysis of a Chinese hamster ovary cell line using Illumina sequencing technology. *BMC Genomics*, 12: 67, doi: 10.1186/1471-2164-12-67: 8 str.

- He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A. 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Molecular Cell*, 12, 6: 1439-1452
- Hernandez Bort J.A., Hackl M., Hoflmayer H., Jadhav V., Harreither E., Kumar N., Ernst W., Grillari J., Borth N. 2012. Dynamic mRNA and miRNA profiling of CHO-K1 suspension cell cultures. *Biotechnology Journal*, 7, 4: 500-515
- Hong W.W., Wu S.C. 2007. A novel RNA silencing vector to improve antigen expression and stability in Chinese hamster ovary cells. *Vaccine*, 25, 20: 4103-4111
- Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Scherf U., Speed T.P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 2: 249-264
- Jacob N.M., Kantardjieff A., Yusufi F.N., Retzel E.F., Mulukutla B.C., Chuah S.H., Yap M., Hu W.S. 2010. Reaching the depth of the Chinese hamster ovary cell transcriptome. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 5: 1002-1009
- Jadhav V., Hackl M., Bort J.A., Wieser M., Harreither E., Kunert R., Borth N., Grillari J. 2012. A screening method to assess biological effects of microRNA overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 6: 1376-1385
- Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S., Yap M.G.S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103, 10: 40-47
- Jeon M.K., Yu D.Y., Lee G.M. 2011. Combinatorial engineering of *ldh-a* and *bcl-2* for reducing lactate production and improving cell growth in dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 4: 779-790
- Johnson K.C., Jacob N.M., Nissom P.M., Hackl M., Lee L.H., Yap M., Hu W.S. 2011. Conserved microRNAs in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 2: 475-480
- Jones D., Kroos N., Anema R., van Montfort B., Vooys A., van der Kraats S., van der Helm E., Smits S., Schouten J., Brouwer K., Lagerwerf F., van Berkel P., Opstelten D.J., Logtenberg T., Bout A. 2003. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6. *Biotechnology Progress*, 19, 1: 163-168
- Jostock T. 2011. Expression of antibody in mammalian cells. V: Antibody expression and production. Al-Rubeai M. (ed). Amsterdam, Springer: 1-24
- Kang S., Ren D., Xiao G., Daris K., Buck L., Enyenihi A.A., Zubarev R., Bondarenko P.V., Deshpande R. 2014. Cell line profiling to improve monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 4: 748-760

- Kantardjieff A., Jacob N.M., Yee J.C., Epstein E., Kok Y.J., Philp R., Betenbaugh M., Hu W.S. 2010. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *Journal of Biotechnology*, 145, 2: 143-159
- Kao F.T., Puck T.T. 1968. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60, 4: 1275-1281
- Kao F.T., Puck T.T. 1970. Genetics of somatic mammalian cells: linkage studies with human-Chinese hamster cell hybrids. *Nature*, 228, 5269: 329-332
- Kaufman R.J. 1990. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods in Enzymology*, 185: 537-66
- Kaufman R.J., Sharp P.A., Latt S.A. 1983. Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 3, 4: 699-711
- Kaufman R.J., Wasley L.C., Spiliotes A.J., Gossels S.D., Latt S.A., Larsen G.R., Kay R.M. 1985. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 7: 1750-1759
- Khoo S.H., Al-Rubeai M. 2009. Detailed understanding of enhanced specific antibody productivity in NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1: 188-199
- Kildegaard H.F., Baycin-Hizal D., Lewis N.E., Betenbaugh M.J. 2013. The emerging CHO systems biology era: harnessing the 'omics revolution for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 6: 1102-1107
- Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 3: 917-930
- Kim M., O'Callaghan P.M., Droms K.A., James D.C. 2011. A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 10: 2434-2446
- Kim S.J., Kim N.S., Ryu C.J., Hong H.J., Lee G.M. 1998. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 1: 73-84
- Klausing S., Kramer O., Noll T. 2011. Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays. *BMC Proceedings*, 5, Suppl 8: P98, doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P98: 3 str.

- Lattenmayer C., Trummer E., Schriebl K., Vorauer-Uhl K., Mueller D., Katinger H., Kunert R. 2007. Characterisation of recombinant CHO cell lines by investigation of protein productivities and genetic parameters. *Journal of Biotechnology*, 128, 4: 716-725
- Lee C.J., Seth G., Tsukuda J., Hamilton R.W. 2009. A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 4: 1107-1118
- Lee M.S., Lee G.M. 2000. Hyperosmotic pressure enhances immunoglobulin transcription rates and secretion rates of KR12H-2 transfectoma. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 3: 260-268
- Leno M., Merten O.W., Hache J. 1992. Kinetic studies of cellular metabolic activity, specific IgG production rate, IgG mRNA stability and accumulation during hybridoma batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 2: 135-140
- Leonxie. 2014. RefFinder.
<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference> (september 2014)
- Lewis B.P., Green R.E., Brenner S.E. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1: 189-192
- Lewis N.E., Liu X., Li Y., Nagarajan H., Yerganian G., O'Brien E., Bordbar A., Roth A.M., Rosenbloom J., Bian C., Xie M., Chen W., Li N., Baycin-Hizal D., Latif H., Forster J., Betenbaugh M.J., Famili I., Xu X., Wang J., Palsson B.O. 2013. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nature Biotechnology*, 31, 8: 759-765
- Li J., Zhang C., Jostock T., Dubel S. 2007. Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. *Protein Engineering, Design & Selection*, 20, 10: 491-496
- Lim S.F., Chuan K.H., Liu S., Loh S.O., Chung B.Y., Ong C.C., Song Z. 2006. RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-batch cultures of CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8, 6: 509-522
- Liu P.Q., Chan E.M., Cost G.J., Zhang L., Wang J., Miller J.C., Guschin D.Y., Reik A., Holmes M.C., Mott J.E., Collingwood T.N., Gregory P.D. 2010. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 1: 97-105
- Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 14, 13: 1675-1680

- Majors B.S., Betenbaugh M.J., Pederson N.E., Chiang G.G. 2009. Mcl-1 overexpression leads to higher viabilities and increased production of humanized monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 25, 4: 1161-1168
- Malone J.H., Oliver B. 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9: 34, doi: 10.1186/1741-7007-9-34: 9 str.
- Malphettes L., Freyvert Y., Chang J., Liu P.Q., Chan E., Miller J.C., Zhou Z., Nguyen T., Tsai C., Snowden A.W., Collingwood T.N., Gregory P.D., Cost G.J. 2010. Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 5: 774-783
- Martin J.A., Wang Z. 2011. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews: Genetics*, 12, 10: 671-682
- McLeod J., O'Callaghan P.M., Pybus L.P., Wilkinson S.J., Root T., Racher A.J., James D.C. 2011. An empirical modeling platform to evaluate the relative control discrete CHO cell synthetic processes exert over recombinant monoclonal antibody production process titer. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 9: 2193-2204
- Meleady P., Gallagher M., Clarke C., Henry M., Sanchez N., Barron N., Clynes M. 2012. Impact of miR-7 over-expression on the proteome of Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*, 160, 3-4: 251-262
- Merten O.W., Moeurs D., Keller H., Leno M., Palfi G.E., Cabanie L., Couve E. 1994. Modified monoclonal antibody production kinetics kappa/gamma mRNA levels, and metabolic activities in a murine hybridoma selected by continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 6: 753-764
- Miller M.B., Tang Y.W. 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 4: 611-633
- Mohan C., Kim Y.G., Koo J., Lee G.M. 2008. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnology Journal*, 3, 5: 624-630
- MOMA. 2014. NormFinder software. Aarhus, Aarhus University Hospital, Department of Molecular Medicine.
<http://moma.dk/normfinder-software> (september 2014)
- Moore C.M., Best R.G. 2001. Chromosome preparation and banding. V: Encyclopedia of life sciences. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: doi: 10.1038/npg.els.0001444: 7 str.
[http://web.udl.es/usuaris/e4650869/docencia/GenClin/content/recursos_classe_\(pdf\)/revisionsPDF/bandmethods1.pdf](http://web.udl.es/usuaris/e4650869/docencia/GenClin/content/recursos_classe_(pdf)/revisionsPDF/bandmethods1.pdf) (oktober 2014)
- Morey J.S., Ryan J.C., Van Dolah F.M. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8: 175-93

- Mori K., Kuni-Kamochi R., Yamane-Ohnuki N., Wakitani M., Yamano K., Imai H., Kanda Y., Niwa R., Iida S., Uchida K., Shitara K., Satoh M. 2004. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 7: 901-908
- Muhrad D., Parker R. 1999. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA*, 5, 10: 1299-1307
- Muller D., Katinger H., Grillari J. 2008. MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories. *Trends in Biotechnology*, 26, 7: 359-365
- Mutskov V., Felsenfeld G. 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO Journal*, 23, 1: 138-149
- Newsholme P., Procopio J., Lima M.M., Pithon-Curi T.C., Curi R. 2003. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, 21, 1: 1-9
- Ngantung F.A., Miller P.G., Brushett F.R., Tang G.L., Wang D.I. 2006. RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 1: 106-119
- Nissom P.M., Sanny A., Kok Y.J., Hiang Y.T., Chuah S.H., Shing T.K., Lee Y.Y., Wong K.T., Hu W.S., Sim M.Y., Philp R. 2006. Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. *Molecular Biotechnology*, 34, 2: 125-140
- O'Callaghan P.M., McLeod J., Pybus L.P., Lovelady C.S., Wilkinson S.J., Racher A.J., Porter A., James D.C. 2010. Cell line-specific control of recombinant monoclonal antibody production by CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 6: 938-951
- Oliveira C.C., McCarthy J.E. 1995. The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15: 8936-8943
- Omasa T., Onitsuka M., Kim W.D. 2010. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 3: 233-240
- Peng R.W., Abellan E., Fussenegger M. 2011. Differential effect of exocytic SNAREs on the production of recombinant proteins in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 3: 611-620
- Peng R.W., Guetg C., Tigges M., Fussenegger M. 2010. The vesicle-trafficking protein munc18b increases the secretory capacity of mammalian cells. *Metabolic Engineering*, 12, 1: 18-25
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45: 6 str.

- Puck T.T., Cieciura S.J., Robinson A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine*, 108, 6: 945-956
- R Development Core Team. 2005. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing: 1369 str.
- Rajagopalan P.T., Zhang Z., McCourt L., Dwyer M., Benkovic S.J., Hammes G.G. 2002. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 21: 13481-13486
- Reisinger H., Steinfellner W., Stern B., Katinger H., Kunert R. 2008. The absence of effect of gene copy number and mRNA level on the amount of mAb secretion from mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 4: 701-710
- Richards E.J., Elgin S.C. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, 4: 489-500
- Riggs M.G., Whittaker R.G., Neumann J.R., Ingram V.M. 1977. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature*, 268, 5619: 462-464
- Ryu J.S., Kim T.K., Chung J.Y., Lee G.M. 2000. Osmoprotective effect of glycine betaine on foreign protein production in hyperosmotic recombinant Chinese hamster ovary cell cultures differs among cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 2: 167-175
- Santiago Y., Chan E., Liu P.Q., Orlando S., Zhang L., Urnov F.D., Holmes M.C., Guschin D., Waite A., Miller J.C., Rebar E.J., Gregory P.D., Klug A., Collingwood T.N. 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15: 5809-5814
- Schaub J., Clemens C., Schorn P., Hildebrandt T., Rust W., Mennerich D., Kaufmann H., Schulz T.W. 2010. CHO gene expression profiling in biopharmaceutical process analysis and design. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 2: 431-438
- Schlatter S., Stansfield S.H., Dinnis D.M., Racher A.J., Birch J.R., James D.C. 2005. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnology Progress*, 21, 1: 122-133
- Seth G., Charaniya S., Wlaschin K.F., Hu W.S. 2007. In pursuit of a super producer-alternative paths to high producing recombinant mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 6: 557-564
- Shen D., Sharfstein S.T. 2006. Genome-wide analysis of the transcriptional response of murine hybridomas to osmotic shock. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 1: 132-145

- Shen D.A., Kiehl T.R., Khattak S.F., Li Z.J., He A.Q., Kayne P.S., Patel V., Neuhaus I.M., Sharfstein S.T. 2010. Transcriptomic Responses to Sodium Chloride-Induced Osmotic Stress: A Study of Industrial Fed-Batch CHO Cell Cultures. *Biotechnology Progress*, 26, 4: 1104-1115
- Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau P., Paques F. 2011. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current Gene Therapy*, 11, 1: 11-27
- Skulj M., Pezdirec D., Gaser D., Kreft M., Zorec R. 2014. Reduction in C-terminal amidated species of recombinant monoclonal antibodies by genetic modification of CHO cells. *BMC Biotechnology*, 14, 1: 76, doi: 10.1186/1472-6750-14-76: 11 str.
- Smales C.M., Dinnis D.M., Stansfield S.H., Alete D., Sage E.A., Birch J.R., Racher A.J., Marshall C.T., James D.C. 2004. Comparative proteomic analysis of GS-NS0 murine myeloma cell lines with varying recombinant monoclonal antibody production rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 4: 474-488
- Smyth G.K. 2005. Limma: linear models for microarray data. V: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Gentleman R., Carey V., Huber W., Irizarry R., Dudoit S., (eds.). New York, Springer: 397-420
- Smyth G.K., Michaud J., Scott H.S. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, 21, 9: 2067-2075
- Son Y.D., Jeong Y.T., Park S.Y., Kim J.H. 2011. Enhanced sialylation of recombinant human erythropoietin in Chinese hamster ovary cells by combinatorial engineering of selected genes. *Glycobiology*, 21, 8: 1019-1028
- Strutzenberger K., Borth N., Kunert R., Steinfellner W., Katinger H. 1999. Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 69, 2-3: 215-226
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 43: 15545-15550
- Sung Y.H., Hwang S.J., Lee G.M. 2005. Influence of down-regulation of caspase-3 by siRNAs on sodium-butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metabolic Engineering*, 7, 5-6: 457-466
- Sung Y.H., Lee J.S., Park S.H., Koo J., Lee G.M. 2007. Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metabolic Engineering*, 9, 5-6: 452-64

- Trummer E., Ernst W., Hesse F., Schriebl K., Lattenmayer C., Kunert R., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Muller D. 2008. Transcriptional profiling of phenotypically different Epo-Fc expressing CHO clones by cross-species microarray analysis. *Biotechnology Journal*, 3, 7: 924-937
- Urlaub G., Chasin L.A. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7: 4216-4220
- Urlaub G., Kas E., Carothers A.M., Chasin L.A. 1983. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*, 33, 2: 405-412
- Urlaub G., Mitchell P.J., Kas E., Chasin L.A., Funanage V.L., Myoda T.T., Hamlin J. 1986. Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 12, 6: 555-566
- Vishwanathan N., Le H., Jacob N.M., Tsao Y.S., Ng S.W., Loo B., Liu Z., Kantardjieff A., Hu W.S. 2014. Transcriptome dynamics of transgene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 3: 518-528
- Walsh G. 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology*, 28, 9: 917-924
- Wilson C., Bellen H.J., Gehring W.J. 1990. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annual Review of Cell Biology*, 6: 679-714
- Wong D.C., Wong K.T., Nissom P.M., Heng C.K., Yap M.G. 2006. Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 3: 350-361
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1: 75-85
- Worton R.G., Ho C.C., Duff C. 1977. Chromosome stability in CHO cells. *Somatic Cell Genetics*, 3, 1: 27-45
- Wu S.C. 2009. RNA interference technology to improve recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Advances*, 27, 4: 417-422
- Wu S.C., Hong W.W., Liu J.H. 2008. Short hairpin RNA targeted to dihydrofolate reductase enhances the immunoglobulin G expression in gene-amplified stable Chinese hamster ovary cells. *Vaccine*, 26, 38: 4969-4974
- Wurm F. 2013. CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes*, 1, 3: 296-311
- Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 11: 1393-1398

- Wurm F.M., Hacker D. 2011. First CHO genome. *Nature Biotechnology*, 29, 8: 718-720
- Xu X., Nagarajan H., Lewis N.E., Pan S., Cai Z., Liu X., Chen W., Xie M., Wang W., Hammond S., Andersen M.R., Neff N., Passarelli B., Koh W., Fan H.C., Wang J., Gui Y., Lee K.H., Betenbaugh M.J., Quake S.R., Famili I., Palsson B.O., Wang J. 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29, 8: 735-741
- Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., Wakitani M., Niwa R., Sakurada M., Uchida K., Shitara K., Satoh M. 2004. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 5: 614-622
- Yee J.C., de Leon Gatti M., Philp R.J., Yap M., Hu W.S. 2008. Genomic and proteomic exploration of CHO and hybridoma cells under sodium butyrate treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 5: 1186-1204
- Yee J.C., Gerdtzen Z.P., Hu W.S. 2009. Comparative transcriptome analysis to unveil genes affecting recombinant protein productivity in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1: 246-263
- Zhou M., Crawford Y., Ng D., Tung J., Pynn A.F., Meier A., Yuk I.H., Vijayasankaran N., Leach K., Joly J., Snedecor B., Shen A. 2011. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Biotechnology*, 153, 1-2: 27-34
- Zhu J. 2012. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30, 5: 1158-1170

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Kristini Gruden za vse dragocene strokovne nasvete, ideje in usmerjanje med raziskovalnim delom.

Hvala prof. dr. Adreju Blejcu za statistično obdelavo podatkov ter Špeli Baebler za konstruktivne strokovne nasvete.

Hvala prof. dr. Mojci Narat za natančen pregled naloge in popravke.

Zahvala gre tudi Andreju Franckyju, ki mi je omogočil izvedbo dela na oddelku Celična in molekularna biologija ter za zaupanje in nasvete pri zasnovi poskusa. Hvala Dominiku Gaserju za podporo in strokoven pregled naloge. Hvala Holgerju Lauxu in njegovi ekipi za pomoč pri delu v njihovem laboratoriju. Hvala tudi Miši Škulj za učenje qPCR ter Katji Glinšek za pomoč pri obdelavi kariotipov.

Najlepša hvala Zlati, Slavku in Mateji za vse iskrene spodbude.

Izo, tebi pa ne le enkrat, ampak vsaj stoenkrat hvala.

PRILOGA A

Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der1 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plastenik (SF)

Productivity for all clones from CHO der1 cell line in 24w microtiter plates (24w) and shake flasks (SF)

produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)		
klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF
G418_P11_1	0	/	G418_P13_18	0	/	G418_P14_23	5	/	MTX_P13_68	/	186
G418_P11_2	0	/	G418_P13_19	0	/	MTX_P11_1	14	/	MTX_P13_69	/	227
G418_P11_3	0	/	G418_P13_20	0	/	MTX_P11_2	8	/	MTX_P13_70	/	413
G418_P11_4	0	5	G418_P13_21	0	/	MTX_P11_3	0	/	MTX_P13_72	/	206
G418_P11_5	0	/	G418_P13_22	13	28	MTX_P11_4	0	/	MTX_P13_75	/	2
G418_P11_6	0	/	G418_P13_23	0	/	MTX_P11_5	20	172	MTX_P13_76	/	192
G418_P11_7	0	/	G418_P13_24	0	/	MTX_P11_6	0	/	MTX_P13_78	/	262
G418_P11_8	5	/	G418_P13_25	0	/	MTX_P11_7	11	/	MTX_P13_79	/	236
G418_P11_9	0	/	G418_P13_26	0	/	MTX_P11_8	0	/	MTX_P13_91	/	219
G418_P11_10	8	/	G418_P13_27	0	/	MTX_P11_9	27	200	MTX_P13_92	/	439
G418_P11_11	0	0	G418_P13_28	0	/	MTX_P11_10	46	139	MTX_P13_95	/	177
G418_P11_12	7	/	G418_P13_29	0	/	MTX_P11_11	5	63	MTX_P13_99	/	0
G418_P11_13	19	22	G418_P13_30	10	/	MTX_P11_12	6	43	MTX_P13_101	/	215
G418_P11_14	0	/	G418_P13_31	10	/	MTX_P11_13	7	/	MTX_P13_105	/	249
G418_P11_15	0	/	G418_P13_32	4	/	MTX_P11_14	0	/	MTX_P13_106	/	87
G418_P11_16	0	/	G418_P13_33	0	/	MTX_P11_15	6	/	MTX_P13_113	/	302.1
G418_P11_17	0	/	G418_P13_34	0	/	MTX_P11_16	27	143	MTX_P13_114	/	306
G418_P11_18	0	0	G418_P13_35	0	0	MTX_P11_17	0	/	MTX_P13_118	/	125
G418_P11_19	0	/	G418_P13_36	11	/	MTX_P11_18	7	/	MTX_P13_122	/	169
G418_P11_20	0	/	G418_P13_37	0	/	MTX_P11_19	21	95	MTX_P13_123	/	1174
G418_P11_21	14	73	G418_P13_38	0	/	MTX_P11_20	37	169	MTX_P13_126	/	101
G418_P11_22	0	/	G418_P13_39	0	/	MTX_P11_21	6	/	MTX_P13_127	/	406
G418_P11_23	0	/	G418_P13_40	0	/	MTX_P11_22	6	/	MTX_P13_133	/	197
G418_P11_24	0	/	G418_P13_41	7	/	MTX_P13_1	/	4	MTX_P13_136	/	111
G418_P11_25	17	234	G418_P13_42	0	/	MTX_P13_4	/	1832	MTX_P13_143	/	3
G418_P11_26	0	/	G418_P13_43	0	/	MTX_P13_5	/	45	MTX_P13_146	/	240
G418_P11_27	0	/	G418_P13_44	0	/	MTX_P13_7	/	214	MTX_P13_147	/	366
G418_P11_28	0	/	G418_P14_1	0	/	MTX_P13_8	/	280	MTX_P13_151	/	223
G418_P11_29	0	/	G418_P14_2	0	/	MTX_P13_9	/	211	MTX_P13_152	/	115
G418_P11_30	0	6	G418_P14_3	6	/	MTX_P13_18	/	404	MTX_P13_157	/	273
G418_P11_31	0	/	G418_P14_4	6	/	MTX_P13_20	/	222	MTX_P13_158	/	265
G418_P11_32	0	/	G418_P14_5	0	/	MTX_P13_27	/	173	MTX_P13_159	/	183
G418_P13_1	0	/	G418_P14_6	4	/	MTX_P13_32	/	183	MTX_P13_160	/	505
G418_P13_2	18	139	G418_P14_7	0	/	MTX_P13_33	/	220	MTX_P13_165	/	200
G418_P13_3	0	/	G418_P14_8	0	/	MTX_P13_34	/	263	MTX_P13_166	/	279
G418_P13_4	11	41	G418_P14_9	0	/	MTX_P13_35	/	658	MTX_P13_167	/	176
G418_P13_5	0	/	G418_P14_10	0	/	MTX_P13_36	/	181	MTX_P13_168	/	343
G418_P13_6	0	/	G418_P14_11	0	0	MTX_P13_38	/	595	MTX_P13_169	/	210
G418_P13_7	0	/	G418_P14_12	8	22	MTX_P13_40	/	1308	MTX_P13_171	/	1209
G418_P13_8	4	/	G418_P14_13	0	/	MTX_P13_43	/	164	MTX_P13_173	/	262
G418_P13_9	0	/	G418_P14_14	5	/	MTX_P13_45	/	224	MTX_P13_174	/	196
G418_P13_10	0	/	G418_P14_15	11	54	MTX_P13_46	/	147	MTX_P13_175	/	312
G418_P13_11	0	0	G418_P14_16	0	/	MTX_P13_52	/	133	MTX_P14_1	0	310
G418_P13_12	0	/	G418_P14_17	0	/	MTX_P13_53	/	197	MTX_P14_2	12	351
G418_P13_13	0	/	G418_P14_18	0	/	MTX_P13_59	/	884	MTX_P14_3	0	282
G418_P13_14	18	41	G418_P14_19	0	6	MTX_P13_61	/	858	MTX_P14_4	0	315
G418_P13_15	0	0	G418_P14_20	0	/	MTX_P13_64	/	576	MTX_P14_5	0	377
G418_P13_16	0	/	G418_P14_21	8	16	MTX_P13_66	/	254			
G418_P13_17	6	/	G418_P14_22	0	0	MTX_P13_67	/	151			

S sivo so označeni izbrani kloni.

The grey colour denotes selected clones.

PRILOGA B

Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der2 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plastenek (SF)

Productivity for all clones from CHO der2 cell line in 24w microtiter plates (24w) and shake flasks (SF)

produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)		
klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF
G418_P1_1	4	7	G418_P2_9	0	/	G418_P3_17	0	0	MTX_P3_2	0	/
G418_P1_2	0	/	G418_P2_10	0	/	G418_P3_18	0	/	MTX_P3_3	0	/
G418_P1_3	0	/	G418_P2_11	0	/	G418_P3_19	0	/	MTX_P3_4	0	/
G418_P1_4	0	/	G418_P2_12	0	/	G418_P3_20	0	/	MTX_P3_5	66	1086
G418_P1_5	0	/	G418_P2_13	0	/	G418_P3_21	0	/	MTX_P3_6	41	199
G418_P1_6	0	/	G418_P2_14	0	0	G418_P3_22	0	/	MTX_P3_7	61	684
G418_P1_7	0	/	G418_P2_15	0	/	G418_P3_23	0	/	MTX_P3_8	0	/
G418_P1_8	0	/	G418_P2_16	0	/	MTX_P1_1	0	/	MTX_P3_9	0	0
G418_P1_9	0	/	G418_P2_17	0	/	MTX_P1_2	6	19	MTX_P3_10	0	/
G418_P1_10	0	/	G418_P2_18	0	/	MTX_P1_3	0	/	MTX_P3_11	8	/
G418_P1_11	0	/	G418_P2_19	6	27	MTX_P1_4	0	/	MTX_P3_12	0	/
G418_P1_12	0	/	G418_P2_20	0	/	MTX_P1_5	0	0	MTX_P3_13	0	/
G418_P1_13	0	/	G418_P2_21	0	/	MTX_P1_6	0	/	MTX_P3_14	0	0
G418_P1_14	0	5	G418_P2_22	7	34	MTX_P1_7	0	0	MTX_P3_15	0	/
G418_P1_15	0	/	G418_P2_23	0	/	MTX_P1_8	0	/	MTX_P3_16	73	949
G418_P1_16	0	/	G418_P2_24	0	/	MTX_P1_9	0	0	MTX_P3_17	0	/
G418_P1_17	0	/	G418_P2_25	0	/	MTX_P1_10	0	/	MTX_P3_18	0	/
G418_P1_18	0	/	G418_P2_26	0	0	MTX_P1_11	7	33	MTX_P3_19	0	/
G418_P1_19	0	/	G418_P2_27	0	/	MTX_P2_1	0	/	MTX_P3_20	0	/
G418_P1_20	0	14	G418_P2_28	0	/	MTX_P2_2	0	/	MTX_P3_21	0	/
G418_P1_21	6	33	G418_P2_29	0	0	MTX_P2_3	0	/	MTX_P3_22	0	/
G418_P1_22	0	/	G418_P2_30	0	/	MTX_P2_4	251	856	MTX_P3_23	0	/
G418_P1_23	0	8	G418_P2_31	0	/	MTX_P2_5	0	/	MTX_P3_24	0	/
G418_P1_24	0	/	G418_P3_1	0	0	MTX_P2_6	0	/	MTX_P3_25	0	/
G418_P1_25	0	/	G418_P3_2	0	15	MTX_P2_7	113	960	MTX_P3_26	0	/
G418_P1_26	0	/	G418_P3_3	0	/	MTX_P2_8	6	/	MTX_P3_27	0	/
G418_P1_27	0	/	G418_P3_4	0	/	MTX_P2_9	0	0	MTX_P3_28	0	/
G418_P1_28	0	/	G418_P3_5	0	0	MTX_P2_10	0	/	MTX_P3_29	0	0
G418_P1_29	0	/	G418_P3_6	0	/	MTX_P2_11	16	/	MTX_P3_30	26	/
G418_P1_30	0	/	G418_P3_7	0	/	MTX_P2_12	0	/	MTX_P3_31	0	/
G418_P1_31	0	7	G418_P3_8	0	/	MTX_P2_13	13	/	MTX_P3_32	34	550
G418_P2_1	0	/	G418_P3_9	0	/	MTX_P2_14	8	/	MTX_P3_33	0	/
G418_P2_2	0	/	G418_P3_10	0	0	MTX_P2_15	0	0	MTX_P3_34	0	/
G418_P2_3	0	26	G418_P3_11	0	/	MTX_P2_16	0	/	MTX_P3_35	0	/
G418_P2_4	0	/	G418_P3_12	0	/	MTX_P2_17	21	/	MTX_P3_36	0	/
G418_P2_5	0	5	G418_P3_13	0	/	MTX_P2_18	478	2018	MTX_P3_37	0	/
G418_P2_6	0	/	G418_P3_14	0	0	MTX_P2_19	0	0	MTX_P3_38	0	/
G418_P2_7	0	/	G418_P3_15	0	/	MTX_P2_20	6	/			
G418_P2_8	0	/	G418_P3_16	0	/	MTX_P3_1	19	/			

S sivo so označeni izbrani kloni.

The grey colour denotes selected clones.

PRILOGA C

Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der3 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plastenek (SF)

Productivity for all clones from CHO der3 cell line in 24w microtiter plates (24w) and shake flasks (SF)

produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)		
klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF
G418_P21_1	9	/	G418_P23_18	19	/	MTX_P21_6	5	194	MTX_P23_17	0	/
G418_P21_2	45	433	G418_P23_19	20	/	MTX_P21_7	14	90	MTX_P23_18	6	/
G418_P21_3	0	/	G418_P23_20	22	190	MTX_P21_8	0	/	MTX_P23_19	0	/
G418_P21_4	10	/	G418_P23_21	20	/	MTX_P21_9	0	/	MTX_P23_20	0	/
G418_P21_5	21	/	G418_P23_22	104	330	MTX_P21_10	0	/	MTX_P23_21	0	/
G418_P21_6	68	266	G418_P23_23	21	/	MTX_P21_11	0	/	MTX_P23_22	0	/
G418_P21_7	5	30	G418_P23_24	19	/	MTX_P21_12	0	/	MTX_P24_1	0	/
G418_P21_8	43	312	G418_P24_1	46	/	MTX_P21_13	13	218	MTX_P24_2	0	/
G418_P21_9	10	/	G418_P24_2	14	/	MTX_P21_14	0	/	MTX_P24_3	5	37
G418_P21_10	0	/	G418_P24_3	41	/	MTX_P21_15	0	/	MTX_P24_4	0	/
G418_P21_11	6	40	G418_P24_4	47	/	MTX_P21_16	0	/	MTX_P24_5	0	/
G418_P21_12	0	/	G418_P24_5	13	138	MTX_P21_17	0	/	MTX_P24_6	0	/
G418_P21_13	15	/	G418_P24_6	22	/	MTX_P21_18	0	/	MTX_P24_7	13	241
G418_P21_14	26	/	G418_P24_7	0	32	MTX_P21_19	0	/	MTX_P24_8	8	/
G418_P21_15	0	44	G418_P24_8	30	/	MTX_P21_20	7	82	MTX_P24_9	0	/
G418_P23_1	16	/	G418_P24_9	55	253	MTX_P21_21	12	213	MTX_P24_10	0	/
G418_P23_2	17	/	G418_P24_10	21	/	MTX_P23_1	7	/	MTX_P24_11	7	/
G418_P23_3	17	/	G418_P24_11	5	83	MTX_P23_2	0	/	MTX_P24_12	19	133
G418_P23_4	15	/	G418_P24_12	15	/	MTX_P23_3	4	75	MTX_P24_13	7	/
G418_P23_5	16	/	G418_P24_13	50	/	MTX_P23_4	0	/	MTX_P24_14	0	/
G418_P23_6	14	/	G418_P24_14	43	/	MTX_P23_5	7	/	MTX_P24_15	0	/
G418_P23_7	0	/	G418_P24_15	18	/	MTX_P23_6	0	/	MTX_P24_16	0	/
G418_P23_8	12	258	G418_P24_16	11	/	MTX_P23_7	0	/	MTX_P24_17	46	287
G418_P23_9	18	/	G418_P24_17	59	/	MTX_P23_8	0	254	MTX_P24_18	0	/
G418_P23_10	6	72	G418_P24_18	0	85	MTX_P23_9	13	/	MTX_P24_19	0	/
G418_P23_11	6	/	G418_P24_19	58	/	MTX_P23_10	0	/	MTX_P24_20	0	/
G418_P23_12	5	129	G418_P24_20	55	263	MTX_P23_11	12	190	MTX_P24_21	4	137
G418_P23_13	16	/	MTX_P21_1	0	/	MTX_P23_12	0	/	MTX_P24_22	15	248
G418_P23_14	5	/	MTX_P21_2	0	/	MTX_P23_13	0	/	MTX_P24_23	0	/
G418_P23_15	18	/	MTX_P21_3	0	/	MTX_P23_14	0	/	MTX_P24_24	18	304
G418_P23_16	23	184	MTX_P21_4	0	342	MTX_P23_15	0	/			
G418_P23_17	19	/	MTX_P21_5	10	148	MTX_P23_16	8	98			

S sivo so označeni izbrani kloni.

The grey colour denotes selected clones.

PRILOGA D

Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der4 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plastenek (SF)

Productivity for all clones from CHO der4 cell line in 24w microtiter plates (24w) and shake flasks (SF)

produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)		
klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF
G418_P41_1	0	/	G418_P42_19	0	/	G418_P45_15	0	/	MTX_P44_4	/	253
G418_P41_2	0	/	G418_P42_20	0	/	G418_P45_16	0	/	MTX_P44_5	/	267
G418_P41_3	0	/	G418_P42_21	0	29	G418_P45_17	0	/	MTX_P44_6	/	233
G418_P41_4	0	/	G418_P42_22	5	/	G418_P45_18	9	35	MTX_P44_7	/	299
G418_P41_5	0	/	G418_P44_1	0	7	G418_P45_19	0	/	MTX_P44_8	/	265
G418_P41_6	0	/	G418_P44_2	0	/	G418_P45_20	0	0	MTX_P44_9	/	323
G418_P41_7	0	/	G418_P44_3	0	/	G418_P45_21	0	/	MTX_P44_10	/	376
G418_P41_8	0	9	G418_P44_4	0	/	G418_P45_22	0	/	MTX_P44_11	/	291
G418_P41_9	0	/	G418_P44_5	0	/	MTX_P41_1	/	/	MTX_P44_12	/	297
G418_P41_10	0	0	G418_P44_6	0	/	MTX_P41_2	/	57	MTX_P44_13	/	/
G418_P41_11	0	/	G418_P44_7	0	/	MTX_P41_3	/	/	MTX_P44_14	/	246
G418_P41_12	0	/	G418_P44_8	0	/	MTX_P41_4	/	/	MTX_P44_15	/	268
G418_P41_13	0	/	G418_P44_9	0	/	MTX_P41_5	/	/	MTX_P44_16	/	20
G418_P41_14	0	/	G418_P44_10	0	/	MTX_P41_6	/	/	MTX_P44_17	/	243
G418_P41_15	0	/	G418_P44_11	0	/	MTX_P41_7	/	/	MTX_P44_18	/	256
G418_P41_16	0	/	G418_P44_12	0	0	MTX_P41_8	/	/	MTX_P44_19	/	195
G418_P41_17	0	/	G418_P44_13	0	/	MTX_P41_9	/	/	MTX_P44_20	/	237
G418_P41_18	0	/	G418_P44_14	0	/	MTX_P41_10	/	/	MTX_P44_21	/	238
G418_P41_19	0	/	G418_P44_15	0	/	MTX_P41_11	/	363	MTX_P44_22	/	304
G418_P41_20	0	/	G418_P44_16	0	/	MTX_P41_12	/	/	MTX_P44_23	/	295
G418_P41_21	0	/	G418_P44_17	0	/	MTX_P41_13	/	/	MTX_P44_24	/	/
G418_P41_22	0	/	G418_P44_18	0	/	MTX_P41_14	/	/	MTX_P45_1	/	/
G418_P41_23	0	0	G418_P44_19	0	/	MTX_P41_15	/	/	MTX_P45_2	/	/
G418_P41_24	0	/	G418_P44_20	0	0	MTX_P41_16	/	95	MTX_P45_3	/	/
G418_P42_1	0	/	G418_P44_21	0	/	MTX_P41_17	/	102	MTX_P45_4	/	260
G418_P42_2	0	/	G418_P44_22	0	0	MTX_P42_1	/	/	MTX_P45_5	/	/
G418_P42_3	0	0	G418_P44_23	0	/	MTX_P42_2	/	347	MTX_P45_6	/	357
G418_P42_4	0	/	G418_P44_24	64	478	MTX_P42_3	/	/	MTX_P45_7	/	37
G418_P42_5	0	/	G418_P45_1	0	10	MTX_P42_4	/	95	MTX_P45_8	/	/
G418_P42_6	0	/	G418_P45_2	0	/	MTX_P42_5	/	/	MTX_P45_9	/	/
G418_P42_7	0	18	G418_P45_3	0	/	MTX_P42_6	/	117	MTX_P45_10	/	/
G418_P42_8	0	/	G418_P45_4	0	/	MTX_P42_7	/	90	MTX_P45_11	/	150
G418_P42_9	0	/	G418_P45_5	0	9	MTX_P42_8	/	106	MTX_P45_12	/	222
G418_P42_10	0	/	G418_P45_6	0	/	MTX_P42_9	/	/	MTX_P45_13	/	262
G418_P42_11	0	/	G418_P45_7	0	/	MTX_P42_10	/	0	MTX_P45_14	/	/
G418_P42_12	0	/	G418_P45_8	0	62	MTX_P42_11	/	/	MTX_P45_15	/	/
G418_P42_13	0	6	G418_P45_9	0	/	MTX_P42_12	/	73	MTX_P45_16	/	/
G418_P42_14	0	/	G418_P45_10	0	8	MTX_P42_13	/	181	MTX_P45_17	/	262
G418_P42_15	0	/	G418_P45_11	0	/	MTX_P42_14	/	313	MTX_P45_18	/	184
G418_P42_16	0	/	G418_P45_12	0	/	MTX_P44_1	/	/	MTX_P45_19	/	/
G418_P42_17	0	/	G418_P45_13	0	/	MTX_P44_2	/	/	MTX_P45_20	/	0
G418_P42_18	0	/	G418_P45_14	0	/	MTX_P44_3	/	201			

S sivo so označeni izbrani kloni.

The grey colour denotes selected clones.

PRILOGA E

Produktivnost vseh ustvarjenih klonov celične linije CHO der6 na ravni mikrotitrskih ploščic (24w) in stresalnih plastenik (SF)

Productivity for all clones from CHO der6 cell line in 24w microtiter plates (24w) and shake flasks (SF)

produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)			produktivnost (mg/L)		
klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF	klon	24w	SF
G418_P33_1	26	60	G418_P34_8	0	0	MTX_P32_21	6	/	MTX_P34_1	0	/
G418_P33_2	0	0	G418_P34_9	0	/	MTX_P32_22	0	/	MTX_P34_2	6	/
G418_P33_3	6	16	G418_P34_10	0	/	MTX_P32_23	0	/	MTX_P34_3	0	/
G418_P33_4	5	/	G418_P34_11	0	/	MTX_P33_1	36	/	MTX_P34_4	0	/
G418_P33_5	0	/	G418_P34_12	0	/	MTX_P33_2	0	/	MTX_P34_5	0	0
G418_P33_6	5	9	G418_P34_13	18	51	MTX_P33_3	37	/	MTX_P34_6	0	/
G418_P33_7	0	/	G418_P34_14	0	/	MTX_P33_4	0	/	MTX_P34_7	0	/
G418_P33_8	0	0	MTX_P32_1	0	/	MTX_P33_5	9	/	MTX_P34_8	0	/
G418_P33_9	0	/	MTX_P32_2	0	/	MTX_P33_6	8	/	MTX_P34_9	0	/
G418_P33_10	0	/	MTX_P32_3	0	0	MTX_P33_7	5	/	MTX_P34_10	0	/
G418_P33_11	0	0	MTX_P32_4	0	0	MTX_P33_8	5	/	MTX_P34_11	33	116
G418_P33_12	0	/	MTX_P32_5	0	/	MTX_P33_9	16	/	MTX_P34_12	0	/
G418_P33_13	0	0	MTX_P32_6	9	/	MTX_P33_10	0	0	MTX_P34_13	0	0
G418_P33_14	0	/	MTX_P32_7	0	/	MTX_P33_11	0	/	MTX_P34_14	0	/
G418_P33_15	0	/	MTX_P32_8	9	/	MTX_P33_12	0	11	MTX_P34_15	0	0
G418_P33_16	0	/	MTX_P32_9	0	/	MTX_P33_13	5	/	MTX_P34_16	0	/
G418_P33_17	0	/	MTX_P32_10	0	0	MTX_P33_14	15	19	MTX_P34_17	0	/
G418_P33_18	0	/	MTX_P32_11	15	32	MTX_P33_15	8	/	MTX_P34_18	0	/
G418_P33_19	0	0	MTX_P32_12	0	/	MTX_P33_16	0	/	MTX_P34_19	0	/
G418_P33_20	0	0	MTX_P32_13	31	44	MTX_P33_17	0	/	MTX_P34_20	0	/
G418_P34_1	0	/	MTX_P32_14	0	/	MTX_P33_18	16	/	MTX_P34_21	0	/
G418_P34_2	0	0	MTX_P32_15	0	/	MTX_P33_19	53	43	MTX_P34_22	7	10
G418_P34_3	0	15	MTX_P32_16	5	/	MTX_P33_20	0	/	MTX_P34_23	43	62
G418_P34_4	0	/	MTX_P32_17	6	/	MTX_P33_21	6	/	MTX_P34_24	0	/
G418_P34_5	0	0	MTX_P32_18	0	/	MTX_P33_22	16	/			
G418_P34_6	0	/	MTX_P32_19	0	/	MTX_P33_23	34	46			
G418_P34_7	0	5	MTX_P32_20	22	60	MTX_P33_24	9	/			

S sivo so označeni izbrani kloni.

The grey colour denotes selected clones.

PRIOLOGA F

Primer poročila kontrole kakovosti s programom Expression Console (Affymetrix) za celično linijo CHO der4

Example of quality control report from Expression Console software (Affymetrix) for CHO der4 cell line

File	Threshold	Test	HZ	VZ	BG	Alpha1	Alpha2	Tau	TGT	SF	NF	ScaleMask	RawQ	BG Avg	BG Std	BG Min	BG Max	Noise Avg	Noise Std	Noise Min	Noise Max	Corner+ Count	Corner+ Count	Corner- Count	
G418_P41_10	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	2.5605	1	All	0.8816	30.3239	0.4990	29.6131	31.8071	1.3669	0.1002	1.1909	1.6755	150	64	18270		
G418_P42_3	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.0655	1	All	0.9126	32.9625	0.6731	31.3840	34.5071	1.3057	0.0572	1.2072	1.4871	130	64	13865		
G418_P42_7	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.6660	1	All	0.8300	31.8121	0.3582	31.0858	32.7000	1.1960	0.0541	1.1053	1.3489	144	64	12230		
G418_P42_21	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.3034	1	All	0.9028	33.5398	0.3519	32.7642	34.4649	1.3358	0.0719	1.2100	1.5391	110	64	14208		
G418_P44_20	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.4275	1	All	0.8453	31.5486	0.5521	30.8203	33.0654	1.1865	0.0903	1.0712	1.4740	114	64	16076		
G418_P44_22	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	2.9451	1	All	0.9158	32.6023	0.2963	31.9964	33.3939	1.3739	0.0827	1.1796	1.6678	110	64	14375		
G418_P44_24	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.3118	1	All	0.8531	31.4055	0.4374	30.7523	32.5661	1.2436	0.0676	1.1191	1.4209	111	64	12084		
G418_P45_8	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	2.9540	1	All	1.0094	36.2302	0.7203	35.2714	38.4052	1.4987	0.0622	1.3975	1.6736	127	64	13751		
G418_P45_18	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.2762	1	All	0.9455	32.9462	0.5615	31.8311	34.3251	1.5047	0.0806	1.3422	1.7306	160	64	15036		
G418_P45_20	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.0056	1	All	0.9209	33.7519	0.5582	32.8994	35.1665	1.3905	0.0793	1.2554	1.6200	103	64	12853		
MTX_P41_2	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.5520	1	All	0.9334	34.1271	0.6051	33.0831	35.7328	1.4192	0.0956	1.2731	1.6716	116	64	12164		
MTX_P41_11	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	2.7861	1	All	0.9634	34.7317	0.8759	33.2784	36.9895	1.5442	0.1281	1.3902	1.5905	147	64	14998		
MTX_P42_2	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.3466	1	All	0.9191	33.4942	0.6695	32.4049	35.2520	1.3552	0.0957	1.2505	1.6193	99	64	13760		
MTX_P42_10	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.1669	1	All	0.9068	33.0892	0.4932	32.0366	34.3816	1.3413	0.0703	1.1909	1.5286	123	64	12950		
MTX_P42_16	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.1201	1	All	0.9139	33.4206	0.5494	32.5027	34.8910	1.3516	0.0699	1.2305	1.6008	152	64	14381		
MTX_P44_16	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.5520	1	All	0.9199	33.1804	0.5868	32.1394	34.6100	1.4223	0.0784	1.2515	1.6963	109	64	14012		
MTX_P44_22	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.4284	1	All	0.9544	34.1462	0.6937	33.0504	36.0499	1.3944	0.0742	1.2524	1.6218	112	64	14903		
MTX_P45_6	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.2146	1	All	0.9422	33.5431	0.5955	32.6092	35.0943	1.4423	0.0948	1.2980	1.7123	122	64	13532		
MTX_P45_7	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.0143	1	All	0.9416	33.2320	0.6110	32.0907	34.9222	1.4396	0.0869	1.3074	1.7235	118	64	14951		
MTX_P45_20	Within Bounds	4	4	2	0.05	0.065	0.015	500	3.7618	1	All	0.8821	32.2144	0.6246	31.2877	33.9930	1.2624	0.0793	1.1165	1.5296	98	64	11556		
File	Corner- Count	#Probe Sets Exceeding Probe Pair Threshold	Probe Pair Threshold	Control Direction	#P	%P	Signal(P)	#M	%	Signal(M)	FI	%A	Signal(A)	Signal(AI)	Signal(AI) nal	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- dap_3_sig	
G418_P41_10	64	61223	1	Antisense	22993	37.56	2282.7	956	2	117.5278	37.24	60.8823	37.1277	881.725	3047.7	P	2904.63	P	1484.43	P	2478.5453	10532			
G418_P42_3	64	61223	1	Antisense	23093	37.72	2360.1	1000	2	100.2222	37.130	60.6471	36.1831	913.814	3066.83	P	2750.47	P	1181.78	P	2333.0271	25951			
G418_P42_7	64	61223	1	Antisense	23215	37.92	2419.7	1059	2	112.1569	36.949	60.3515	37.0595	941.833	4528.89	P	3761.64	P	1966.89	P	3419.0586	23026			
G418_P42_21	64	61223	1	Antisense	21853	35.69	2626.7	943	2	94.42311	38.427	62.7656	32.9794	959.719	4156.99	P	3813.47	P	1571.37	P	3180.6131	26455			
G418_P44_20	64	61223	1	Antisense	22390	36.57	2447.6	954	2	103.063	37.879	61.8705	35.7932	918.877	2804.44	P	1985.18	P	1186.47	P	1992.0289	23637			
G418_P44_22	64	61223	1	Antisense	23288	38.04	2248.5	923	2	88.65128	37.012	60.4544	32.4771	876.259	2871.92	P	2417.27	P	1191.19	P	2160.1238	24110			
G418_P44_24	64	61223	1	Antisense	22417	36.62	2430.7	964	2	105.9409	37.842	61.8101	34.3447	912.895	2592.44	P	2348.79	P	1088.44	P	2009.8873	23818			
G418_P45_8	64	61223	1	Antisense	23294	38.05	2256.7	982	2	102.9659	36.947	60.3482	37.3549	882.863	2577.31	P	2581.99	P	1217.87	P	2512.7256	21262			
G418_P45_18	64	61223	1	Antisense	23109	37.75	2284.4	1049	2	160.3363	37.065	60.5441	43.1372	891.238	2864.97	P	2816.94	P	1363.91	P	2348.6072	21006			
G418_P45_20	64	61223	1	Antisense	23823	38.91	2197.1	1045	2	100.9152	36.355	59.3813	34.8938	918.832	3132.66	P	2818.75	P	1319.3	P	2423.5703	23745			
MTX_P41_2	64	61223	1	Antisense	22903	35.94	2501	1061	2	123.8552	38.159	62.3279	43.6719	928.192	3631.87	P	3190.69	P	1910.69	P	2785.4141	23681			
MTX_P41_11	64	61223	1	Antisense	22026	35.98	2413.7	951	2	120.8009	38.246	62.47	40.046	895.261	2357.61	P	2525.17	P	1086.52	P	1989.7368	21699			
MTX_P42_2	64	61223	1	Antisense	23499	38.38	2267.7	968	2	96.17707	36.756	60.0363	36.2158	893.667	3114.98	P	2886.71	P	1585.99	P	2529.2268	19641			
MTX_P42_10	64	61223	1	Antisense	23197	37.89	2314.9	996	2	125.6285	37.300	60.4838	35.8111	900.811	3514.22	P	3406.57	P	1498.31	P	2806.0188	23455			
MTX_P42_16	64	61223	1	Antisense	22032	35.99	2481	951	2	112.2966	38.240	62.4602	38.8226	918.832	3234.59	P	3095.23	P	172.18	P	2601.0129	21971			
MTX_P44_16	64	61223	1	Antisense	22401	36.59	2423.2	970	2	103.4443	37.852	61.8264	37.6522	911.555	4564.29	P	4324.87	P	1771	P	3553.3838	22772			
MTX_P44_22	64	61223	1	Antisense	22321	36.46	2460.8	962	2	103.2819	37.940	61.9702	35.0958	920.553	3978.51	P	3715.98	P	1846.19	P	3180.2258	21550			
MTX_P45_6	64	61223	1	Antisense	23496	38.38	2278.1	986	2	99.97377	36.741	60.0118	35.321	897.097	3336.56	P	3220.77	P	1571.5	P	2709.6123	21232			
MTX_P45_7	64	61223	1	Antisense	22801	37.24	2306.1	939	2	114.0697	37.483	61.2237	33.7059	881.23	4460.76	P	4033.96	P	1906.85	P	3467.1185	23393			
MTX_P45_20	64	61223	1	Antisense	22930	37.45	2367.1	951	2	102.6168	37.342	60.9934	33.6246	908.469	3594.88	P	3002.45	P	1598.19	P	2751.8362	22493			
File	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig	Spike AF FX-r2-Bs- lys_3_sig		
G418_P41_10	273.706	P	110.631	P	230.026	P	204.788	1.1899	392.525	P	281.515	P	483.852	P	386.631	0.80791	822.919	P	656.664	P	308.481	P	596.021	2.66765	1548.33
G418_P42_3	270.083	P	144.077	P	191.679	P	202.08	1.41112	329.499	P	210.856	P	404.536	P	315.15	0.81565	839.265	P	584.078	P	345.852	P	598.732	2.42666	1261.22
G418_P42_7	359.066	P	230.261	P	271.696	P	287.007	1.32158	404.389	P	364.725	P	689.035	P	486.409	0.58689	1172.39	P	716.645	P	435.511	P	774.862	2.69174	1560.97
G418_P42_21	392.62	P	219.811	P	236.338	P	282.923	1.66126	535.052	P	311.663	P	573.264	P	473.326	0.93334	989.65	P	819.263	P	401.125	P	736.68	2.46719	1431.91
G418_P44_20	208.776	P	126.871	P	208.515	P	181.387	1.00125	348.063	P	233.325	P	402.445	P	328.124	0.86621	820.301	P	644.851	P	295.508	P	553.553	2.7759	1892.41
G418_P44_22	172.835	P	145.38	P	188.669	P	168.962	0.91607	333.954	P	236.56	P	434.261	P	334.925	0.76902	652.975	P	561.37	P	340.969	P	518.438	1.91505	1114.14
G418_P44_24	241.972	P	115.422	P	179.86	P	179.085	1.34534	353.73	P	190.377	P	379.966	P	308.024	0.93095	709.939	P	502.365	P	272.408	P	494.904	2.60616	1313.43
G418_P45_8	239	P	128.797	P	189.755	P	185.851	1.25952	335.482	P	225.323	P	343.113	P	301.276	0.97776	645.152	P							